

SUÉLEN DETONI

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
TRITERPENO SINTÉTICO METIL-BARDOXOLONA EM UM
MODELO DE ATAQUE AGUDO DE GOTA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Dr. Juliano Ferreira
Co-orientador(a): Dra. Raquel Tonello

Florianópolis
Novembro/2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

DETONI, SUELEN
EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
TRITERPENO SINTÉTICO METIL-BARDOXOLONA EM UM MODELO DE
ATAQUE AGUDO DE GOTA EM CAMUNDONGOS / SUELEN DETONI ;
orientador, Dr. Juliano Ferreira ; coorientadora, Dr.
Raquel Tonello. - Florianópolis, SC, 2016.
106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências


1. Saúde. 2. GOTA. 3. CDDO-Me. 4. NOCICEPÇÃO. 5.
ESTESSE OXIDATIVO. I. Ferreira, Dr. Juliano. II. Tonello,
Dr. Raquel . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. IV.
Título.

"Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do triterpeno sintético metilbardo-xolona em um modelo de ataque agudo de gota em camundongos"

Por

Suêlen Detoni

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (030/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Thiago Mattar Cunha (USP - Ribeirão Preto - videoconferência)



Dr(a) Giles Alexander Rae (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 04 de Novembro de 2016.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe Wilma Detoni, ao meu pai Daltro Detoni e a minha irmã Chaline Detoni, por serem meus exemplos de amor, dedicação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Juliano Ferreira por ter aberto as portas do seu laboratório, dividido seu conhecimento e proporcionado um aprendizado sem igual. Vou levar como exemplo a sua ética e a sua paixão pela ciência. Me faltam palavras para agradecer sua paciência e dedicação, muito obrigada.

À minha co-orientadora Dra. Raquel Tonello, pela amizade e por toda ajuda presencial e à distância durante a realização deste trabalho, sua ajuda foi fundamental na construção deste.

Ao meu colega Sérgio José Macedo Júnior por compartilhar seus conhecimentos, por ajudar a planejar e realizar os experimentos deste trabalho e pela ajuda incansável nas discussões dos resultados.

Aos meus colegas do laboratório, em especial a Marcella e ao Mallone pelos momentos de discussões científicas, bem como pelos maravilhosos momentos de amizade.

A professor Dra. Sara Marchesan de Oliveira e à Camila Camponogara Dalla Pozza da Universidade Federal de Santa Maria pelas orientações e dosagens de MPO e IL-1 β . Não tenho palavras para agradecer pela paciência e contribuição neste trabalho.

A Dra. Gabriela Trevisan dos Santos da Unesc por me ensinar a técnica de indução da artrite gotosa, pelas orientações e pela dosagem de H₂O₂. Seus ensinamentos e sua contribuição foram fundamentais, muito obrigada.

Ao professor Dr. Marcelo Farina por ter aberto as portas do seu laboratório para as dosagens de estresse oxidativo e principalmente a Dra.

Dirleise Colle por ter me ajudado e orientado em cada experimento. Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Dr. Anicleto Poli, Dra. Thereza Lima e Dr. Fernando Spiller por terem compartilhado seus conhecimentos durante meu estágio de docência.

Aos professores Dr. Thiago Cunha, Dr. Giles Rae, Dra. Helena Cimaroski e Dr. Rui Predger muito obrigada por aceitarem compor a banca e pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

Aos meus pais, Daltro e Wilma muito obrigada por tudo o que fizeram por mim desde o momento em que fui concebida. Sem vocês com certeza essa conquista não seria possível. Amo muito vocês.

Minha irmã Chaline, fonte de inspiração e ao meu sobrinho Pedro, com a sua chegada meus dias se tornaram mais doces.

Ao Gustavo, obrigada por todas as palavras de incentivo e por toda compreensão ao longo destes dois anos que passamos longe. Você foi o meu maior incentivador.

Às minhas amigas Giseli e Roberta, obrigada pela amizade, compreensão e consolo ao longo de todos esses anos de amizade.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e a todos meus colegas de pós-graduação.

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A gota é uma forma de artrite inflamatória extremamente dolorosa causada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações. A terapia farmacológica para a gota é prejudicada pelos efeitos adversos e pela refratariedade que os pacientes desenvolvem aos fármacos utilizados atualmente, indicando que novos agentes antigota são necessários. Vias anti-inflamatórias e antioxidantes parecem ser um alvo em potencial no tratamento da gota. O triterpeno sintético metilbardoxolona (metil-2-ciano 3,12-dioxooleano-1,9-dien-28-oato; CDDO-Me) é um potente indutor de vias de sinalização anti-inflamatórias e antioxidantes (incluindo aquelas que são reguladas pelo fator de transcrição Nrf2) que está sendo testado clinicamente para o tratamento de tumores sólidos, linfomas, doença renal crônica e hipertensão arterial pulmonar. Com base no exposto, este estudo objetivou avaliar o efeito do triterpeno sintético CDDO-Me em um modelo de ataque agudo de gota em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos e os experimentos foram realizados de maneira cega e randomizada. Os animais foram previamente tratados com o CDDO-Me, indometacina ou veículo durante três dias por via oral. No terceiro dia, os animais foram injetados intra-articularmente (i.a.) com cristais de MSU para induzir um ataque agudo de gota. Foram avaliados parâmetros nociceptivos, inflamatórios e toxicológicos após a injeção de MSU. O tratamento com CDDO por 3 dias ou indometacina não alterou o consumo de água ou ração e o peso corporal dos animais. Comparado aos animais não tratados, animais tratados com MSU e veículo apresentaram nocicepção espontânea, hiperalgesia mecânica e edema na articulação que recebeu a

administração de MSU, além de alterar as concentrações séricas de ácido úrico e de alguns marcadores inflamatórios/oxidantes na articulação (número de leucócitos, proteína, peróxido de hidrogênio e atividades da mieloperoxidase e da glutamato cisteína ligase), mas não no soro (interleucina-6/IL-6 e proteína amiloide A/SAA). O tratamento com CDDO-Me ou indometacina foi capaz de prevenir a hiperalgesia, a nocicepção, o edema e o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio induzidos pelo MSU. O CDDO-Me, mas não a indometacina, também preveniu a infiltração de leucócitos. Comparado ao grupo veículo, o tratamento com CDDO aumentou as concentrações séricas da IL-6 ou da SAA e o tratamento com indometacina aumentou as concentrações articulares de interleucina-1 β . Finalmente não foi detectada atividade do fator Nrf2 na articulação dos animais pelo imunoensaio utilizado. Analisados em conjunto os presentes resultados demonstram que o tratamento com CDDO-Me pode prevenir parcialmente o desenvolvimento do ataque aguda de gota em camundongos, porém sugerem que o CDDO-Me não parece ser superior à indometacina em produzir este efeito.

Palavras chave: gota, CDDO-Me, nocicepção, inflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Gout is an extremely painful form of inflammatory arthritis caused by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in the joints. Adverse effects impair the pharmacological therapy for gout and the refractoriness developed by patients currently used to drugs, which indicates the necessity for new anti-gout agents. Antiinflammatory and antioxidant pathways appear to be potential target in the treatment of gout. The synthetic triterpene methyl-bardoloxone (2-methyl-3,12-dioxooleano cyano-1,9-dien-28-oate; CDDO-Me), is a potent inducer of anti-inflammatory and antioxidant signaling pathways, (including those regulated by the transcription factor Nrf2), which is being clinically tested for the treatment of solid tumors, lymphomas, chronic kidney disease and pulmonary arterial hypertension. Based on the above, this study aimed to evaluate the effect of the synthetic triterpene CDDO-Me in an acute attack of gout model in mice. Swiss adult male mice were used and the experiments were performed in a blind and randomized manner. The animals were pretreated with CDDO-Me, indomethacin or vehicle for three days through oral route. On the third day, the animals were injected intra-articularly (i.a.) with MSU crystals to induce an acute attack of gout. Nociceptive, inflammatory and toxicological parameters were evaluated after MSU injection. Treatment with CDDO-Me or indomethacin for 3 days did not alter water and food consumption or bodyweight of animals. Compared with control animals, MSU and vehicle-treated animals presented spontaneous nociception, hyperalgesia, edema, and altered serum concentrations of uric acid and some inflammatory/oxidative markers in the joint (white blood cell count, protein, hydrogen peroxide

and myeloperoxidase activity glutamate cysteine ligase), but not in serum (interleukin-6 and amyloid protein A/SAA). Treatment with CDDO-Me or indomethacin was able to prevent spontaneous nociception, hyperalgesia, edema and the MSU-induced increase in hydrogen peroxide concentration. CDDO-Me, but not indomethacin also prevented leukocyte infiltration. Compared with vehicle group, treatment with CDDO-Me increased serum levels of interleukin-6 or A/SAA and treatment with indomethacin increased the articular concentrations of interleukin-1 β . Finally, Nrf-2 factor activity was not detected in the articulation of animals with the immunoassay used. Taken together, our results show that treatment with CDDO-Me can partially prevent the development of an acute attack of gout in mice, but also suggest that CDDO-Me does not appear to be more effective than indomethacin in mediating such effect.

Keywords: gout; CDDO-Me, nociception, inflammation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do CDDO, CDDO-Me, CDDO-Ma, CCDO-Ea, e CDDO-Im.

Figura 2. Esquema representativo do protocolo experimental.

Figura 3. Curva de dose-resposta do CDDO-Me sobre os limiares nociceptivos de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

Figura 4. Duração da redução dos limiares nociceptivos em camundongos, após à indução de um ataque gota.

Figura 5. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina sobre o nível sérico de ácido úrico em camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

Figura 6. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina no edema articular, no número de leucócitos, na atividade de mieloperoxidase e na quantidade de proteínas no lavado articular de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

Figura 7. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina sobre os níveis séricos da interleucina IL-6 e da proteína SAA em camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

Figura 8. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina no nível da interleucina IL-1 β no extrato citosólico do sobrenadante do lavado articular de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

Figura 9. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-ME ou indometacina sobre os parâmetros de estresse oxidativo no tecido articular de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Terapia empregada para o tratamento da gota demonstrando a sequência de medidas profiláticas e farmacológicas a serem tomadas após o diagnóstico de gota.

Quadro 2: Comparação dos resultados obtidos após o tratamento prévio com CDDO-Me ou Indometacina em camundongos submetidos a um modelo de ataque agudo de gota.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala do comportamento nociceptivo do animal parado (A) e caminhando (B).

Tabela 2. Efeito do CDDO-Me sobre parâmetros nociceptivos e edema articular em camundongos.

Tabela 3. Efeito do tratamento com veículo, CDDO-Me e indometacina sobre consumo de água, ração e peso corporal em camundongos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic)
AINES	Anti-inflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ARRIVE	Animal research, reporting of in vivo experiments
ATP	Trifosfato de adenosina
AU	Ácido úrico
AUS	Ácido úrico sérico
BSA	Albumina de soro bovino
CDDO-Me	Ácido 2-ciano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic metil éster
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
DsDNA	Dupla fita de DNA
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GCL	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione-S-transferase

H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HPRO	Peroxidase de rabanete
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL6-R	Receptor IL-6
KEAP1	Proteína repressora de Nrf2
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
MSU	Cristal de urato monossódico
Na₂-ATP	Adenosina 5'-trifosfato disódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-KB	Fator nuclear Kappa β
NLRP3	Domínio contendo 3 proteínas
NP-40	Nonidep-40
NPSH	Glutationa reduzida
Nrf2	Fator nuclear eritróide relacionado com o fator 2
NSAID	Anti-inflamatório não-esteroidal
O₂-	Superóxido
OH.	Radical hidroxil
OH-1	Heme-oxigenase 1
PBS	Tampão fosfato-salino
Phenol Red	Fenolftaleína
PK	Piruvato cinase
PPAR-γ	Receptor peroxissoma gama ativado por proliferador
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio

SAA	Fator amielóide sérico
sIL-6R	IL-6 solúvel
SOD	Superóxido dismutase
SyK	Baço tirosina cinase
TCA	Ácido tricloroacético
TFK	Tampão fosfato de potássio
TLR	Receptor do tipo Toll Like
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRPA1	Receptor de potencial transitório A1
TRU	Terapia de redução de urato
TRX	Tioredoxina
URAT1	Transportador de Urato 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Gota	27
1.2 Epidemiologia e Genética da Gota.....	28
1.3 História e Fisiopatologia da Gota	32
1.4 Apresentação Clínica da Gota	35
1.5 Terapia Farmacológica e Não-Farmacológica	38
1.6 Estresse Oxidativo e Gota.....	43
1.7 Triterpenos e CDDO-Me	47
2. Objetivos	52
2.1 Objetivo geral.....	52
2.2 Objetivos Específicos.....	52
3. Hipótese.....	53
4. Métodos.....	54
4.1 Animais	54
4.2 Drogas e Tratamento	55
4.3 Protocolo Experimental.....	55
4.4 Medidas de Nocicepção e Inflamação.....	58
4.5 Mensuração do diâmetro articular.....	60
4.6 Coleta de Amostras	60
4.7 Determinação de Parâmetros Inflamatórios	61
4.7.1 Dosagem de SAA.....	61
4.7.2 Dosagem de Ácido Úrico.....	61
4.7.3 Dosagem de IL-6.....	62
4.7.4 Contagem Total de Leucócitos	63
4.7.5 Dosagem de Mieloperoxidase	63

4.8 Dosagem de Proteínas.....	63
4.9 Extração Nuclear.....	64
4.10 Dosagem de Nrf2	65
4.11 Dosagem de IL-1 β	65
4.12 Dosagem de glutathiona.....	66
4.13 Dosagem de glutamato cisteína ligase	66
4.14 Dosagem de peróxido de hidrogênio	67
4.15 Análise Estatística.....	67
5. RESULTADOS	69
5.1 Tratamento.....	69
5.2 Efeito do tratamento com CDDO-Me na hiperalgesia mecânica e nocicepção espontânea após protocolo experimental de artrite gotosa.....	71
5.3 Nível sérico de ácido úrico	75
5.4 Diâmetro articular, número de leucócitos, nível de MPO e de proteínas no fluído sinovial.....	76
5.5 Dosagem de SAA e IL-6 como marcadores inflamatórios séricos	78
5.6 Níveis de IL-1 β no fluído sinovial.....	79
5.7 Níveis de estresse oxidativo no tecido articular.....	80
5.8 Nível de Nrf2 no extrato nuclear da articulação	83
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO.....	97
8. REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO I.....	106

INTRODUÇÃO

1.1 Gota

A gota é a forma mais comum de artrite inflamatória causada pela cristalização e deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações e tecidos subcutâneos. É considerada uma das condições agudas mais dolorosas que os seres humanos podem experimentar e manifesta-se comumente como episódios súbitos de artrite. Classicamente, a primeira articulação a ser afetada é a articulação do hálux, porém outras articulações podem ser afetadas (ROCK et al., 2013; DALBERTH; STAMP, 2014; PASCUAL, 2015; KUO, 2015).

A gota apresenta um rápido desenvolvimento de sinovite monoarticular periférica extremamente dolorosa, mas autolimitada, com resolução dentro de alguns dias ou 1-2 semanas. A deposição a longo prazo de cristais de MSU pode resultar na condição denominada gota tofácea que se caracteriza por agregados de cristais de MSU levando à formação de tofos no tecido subcutâneo, deformando a articulação afetada podendo desenvolver-se em diversos locais tais como a hélice da orelha, o processo olecrano do cotovelo e os tendões de Aquiles (ROCK et al., 2013; DALBETH; STAMP, 20014; PASCUAL, 2015; KUO, 2015;).

A formação e deposição de cristais de MSU nas articulações é resultado principalmente da elevação nos níveis séricos de ácido úrico, condição chamada de hiperuricemia e a magnitude do depósito estende-se enquanto persistir a hiperuricemia. No entanto, nem todos os pacientes hiperuricêmicos desenvolvem gota (DALBETH; STAMP, 2014). Em indivíduos saudáveis, o nível sérico de ácido úrico é de aproximadamente 6,0 mg/dL, o que já é notavelmente alto considerando o nível do limiar de

saturação do ácido úrico nos fluidos biológicos, que é de aproximadamente 7,0 mg/dL. Quando se desenvolve hiperuricemia pela ingestão excessiva de purinas, diminuição da excreção de ácido úrico e/ou pré-disposição genética, a saturação de ácido úrico nos fluidos corporais eleva o risco do desenvolvimento de cristais de MSU nas articulações (ROCK et al., 2013).

1.2 Epidemiologia e Genética da Gota

A carga global da gota é substancial e parece estar aumentando ao longo dos últimos 50 anos em muitas partes do mundo (KUO et al. 2015). As diferenças metodológicas e dados limitados não permitem a comparação precisa da epidemiologia entre os países do mundo. A proporção de indivíduos dentro de uma população que tem gota é altamente variável em todo o mundo, sendo a maior prevalência relatada em países do Pacífico. Com base nos dados coletados referentes aos últimos 15 anos, a gota tende a atingir mais indivíduos em países desenvolvidos do que nos países em desenvolvimento. Pode-se citar como exemplo a baixa prevalência em Portugal (0,3%) e alta na Grécia (4,8%) e EUA (3,9%) (MacFARLANE; KIM, 2014).

Em todos os países, a prevalência de gota aumenta com a idade, apresentando aumento no número de casos em indivíduos mais velhos. Além disso, a prevalência de gota é significativamente maior nos homens do que nas mulheres, com uma relação homem-mulher de 3-4:1. Curiosamente, a idade média de início de gota em mulheres é adiada por aproximadamente 10 anos quando comparado com a média de idade de aparecimento da gota em homens, o que é atribuído ao aumento da excreção de urato renal pelo estrogênio. No entanto, existe um elevado

risco de hiperuricemia e gota em mulheres na menopausa (MacFARLANE; KIM, 2014).

Existem poucos estudos sobre a incidência de gota comparando-se com a prevalência. Em geral, a incidência é duas a seis vezes mais elevada nos homens do que nas mulheres e aumenta com a idade, atingindo um patamar após os 70 anos. Nos EUA, um estudo recente, no qual foram acompanhados 11.963 pacientes com idade entre 45-64 anos no período entre 1987-2012 estimou-se a incidência de gota em 0,84 casos por 1000 pessoas-ano. No Reino Unido, um estudo recente indicou que a incidência de gota foi de 2,68 casos por 1000 pessoas-ano na população adulta entre 2000 e 2007 (KUO et al., 2015).

Devido à gota ser causada pela deposição de cristais de MSU, vários fatores influenciam os níveis séricos de ácido úrico e/ou facilitam a formação de cristais MSU, como fatores socioeconômicos, dietéticos, co-morbidades, medicamentos, substâncias tóxicas e a predisposição genética, são fatores importantes na determinação do risco de desenvolvimento da gota (KUO et al., 2015).

Diversos fatores socioeconômicos estão associados com o risco de gota. Normalmente, o risco é menor em residentes rurais do que nos residentes urbanos e aumenta em pessoas que têm profissões qualificadas não-manuais do que em indivíduos que exercem ocupações profissionais manuais. Dieta e consumo de álcool também têm um papel importante no desenvolvimento da gota. Alimentos ricos em purinas, como carne vermelha, carne de órgãos, determinados tipos de peixe e vegetais, aumentam o risco de gota. Existe uma relação entre o risco de gota e o consumo de álcool, especialmente de cerveja, que contém a purina guanosina em adição ao álcool. Além disso, refrigerantes e a ingestão de

frutose também aumentam o risco, pois a frutose pode induzir a hiperuricemia. Por outro lado, café, produtos lácteos, cerejas, e ingestão de vitamina C tem uma associação negativa com o risco de gota (MacFARLANE; KIM, 2014; KUO et al., 2015).

Alguns medicamentos influenciam no risco de ter um ataque agudo de gota, geralmente, por alterarem a excreção renal de ácido úrico, o que consequentemente, influencia os níveis séricos. Alguns diuréticos, anti-hipertensivos, imunossupressores e medicamentos antirretrovirais, bem como uma dose baixa de aspirina, pirazinamida ou niacina foram associados com o aumento da probabilidade para a gota. Por outro lado, os bloqueadores dos canais de cálcio e a losartana foram associados com um menor risco (RICHETTE; BARDIN, 2010; KUO et al., 2015).

Os fatores genéticos também contribuem para o desenvolvimento da gota. A agregação de gota dentro das famílias é forte, com uma herdabilidade de 35,1% nos homens e 17% nas mulheres, o que confirma a importância de fatores genéticos e ambientais na susceptibilidade à doença. Formas familiares raras de gota e hiperuricemia incluem defeitos por mutações em componentes da via metabólica das purinas, tais como deficiência de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e hiperatividade da fosforibosil pirofosfato sintetase I, e doenças renais hereditárias como nefropatia hiperuricêmica familiar juvenil causada por uma mutação no gene da Uromodulina (REGINATO, et al.; 2012).

A hiperuricemia é um pré-requisito fisiológico para a gota. Em termos de patogênese, os cristais de MSU podem se formar quando o nível sérico de ácido úrico sobe acima do limite de saturação para formação de cristais de MSU (cerca de 392 mmol/L ou 6,6 mg/dL a 37°C). A incidência cumulativa para recém-diagnosticados e o risco para a gota

são mais elevados em pacientes com hiperuricemia assintomática sustentada, do que naqueles com níveis normais de ácido úrico séricos (KUO et al., 2015).

Além da excreção de ácido úrico, outros mecanismos estão envolvidos na alteração do risco da gota, incluindo a indução de distúrbio metabólico e a produção de mediadores inflamatórios. Além disso, a intoxicação por chumbo está associada com o aumento da prevalência da gota, possivelmente pela inibição da excreção de urato e aceleração de insuficiência renal progressiva. Certos fatores e doenças, tais como a temperatura, forças mecânicas, sulfato de condroitina, sulfato de cálcio, pH baixo, chumbo e a osteoartrite parecem facilitar a formação de cristais de MSU e o desenvolvimento de um ataque agudo de gota, apesar das evidências para estas relações serem limitadas (RICHETTE; BARDIN, 2010; KUO et al., 2015).

Estudos de associação genômica identificaram recentemente polimorfismos de genes em um único nucleotídeo que codifica transportadores envolvidos na depuração renal e intestinal de ácido úrico, como SLC22A12/URAT1, SLC2A9/GLUT9 e ABCG2, que contribuem para a herdabilidade da gota (REGINATO et al. 2012). Além disso, estudos de associação de genoma identificaram os locis 28 e 23 com a gota. As associações identificadas explicam apenas uma pequena parte da variação nos níveis de ácido úrico sérico (AUS), porém parece haver lacunas ainda não identificadas entre as associações genéticas conhecidas e a herdabilidade de níveis elevados AUS e gota (REGINATO, et al 2012).

1.3 História e Fisiopatologia da Gota

Embora a gota tenha sido considerada uma entidade clínica por milênios, indicações sobre sua patogênese vieram de *Sir* Alfred Baring Garrod que, em meados do século XIX, desenvolveu um método para medir o ácido úrico no sangue e na urina, que indicou que a deposição de MSU era a causa e não o efeito da inflamação gotosa. No entanto, cristais de MSU foram definitivamente associados à fisiopatologia da gota apenas no início da década de 1960. McCarty e Hollander demonstraram a presença de cristais de MSU no líquido sinovial de pacientes com gota usando microscopia de luz polarizada. Desde então, a presença de cristais de urato no fluido das articulações foi usada para o diagnóstico de gota. Além disso, Seegmiller e McCarty demonstraram que a injeção intra-articular de cristais de MSU em voluntários humanos causava uma inflamação aguda e rápida com todas as características de um ataque agudo de gota. Estes resultados indicaram claramente que os cristais de MSU são o gatilho inicial e incitaram as questões fundamentais de como os cristais MSU são formados e como eles ativam o sistema imunológico para conduzir a inflamação (NUKI; SIMKIN, 2006; MALAWISTA et al., 2011).

Em humanos, o ácido úrico é o produto final do metabolismo da purina, e os níveis de ácido úrico são mais elevados em seres humanos do que na maior parte dos outros animais. Como os seres humanos não têm a capacidade de produzir a enzima uricase, responsável em converter o ácido úrico relativamente insolúvel em alantoína, um composto altamente solúvel, a produção endógena de ácido úrico através da degradação das purinas geralmente contribui para aproximadamente dois terços do urato no corpo e o restante é contribuído pela dieta. A maioria do ácido úrico é

excretado pelos rins e o restante é eliminado através do trato biliar. Na grande maioria das pessoas com gota, a redução da eficiência da depuração renal leva à hiperuricemia (TERKELTAUB, 2010).

Para a formação de cristais, o produto iônico do sódio e do ácido úrico deve ser igual ou superior ao nível de saturação em que cristais MSU podem se formar. O ácido úrico é um ácido fraco com um pKa de 5,75 existindo principalmente sob a forma ionizada (urato) no pH fisiológico de 7,40. A hiperuricemia é um dos principais fatores de risco para a gota, porém apenas uma parcela dos indivíduos com níveis elevados de ácido úrico desenvolvem gota, outros fatores além do fator iônico podem determinar a formação dos cristais (RICHETTE; BARDIN, 2010).

A solubilidade do urato em fluidos corporais depende do estado de hidratação articular, temperatura, pH, concentração de cátions e a presença de proteínas de matriz extracelular. Variações nestes fatores podem explicar a predileção da gota pela primeira articulação metatarsal-falângica (uma junta periférica com temperatura baixa), por articulações osteoartíticas (articulações com diminuição de colágeno e teor de proteoglicano) e pelo aparecimento da dor noturna (por causa da desidratação intra-articular). Outros fatores que podem desencadear a deposição de cristais de MSU incluem trauma local articular, infecção e cirurgia (RICHETTE; BARDIN, 2010).

Embora o mecanismo preciso da inflamação gotosa permanece incerto, vários mecanismos têm sido propostos. Cristais de MSU poderiam ativar monócitos através da via receptor Toll Like (TLR) e inflamasoma (NLRP3). O reconhecimento de cristais de MSU extracelulares por TLR2 e TLR4 expressos por macrófagos poderia induzir a transcrição da interleucina-1 β (IL-1 β). A transdução do sinal

TLR2 e TLR4 depende de MyD88, uma proteína adaptadora. Outro componente da ativação de macrófagos é o CD14, um receptor de reconhecimento de padrões expresso em fagócitos que interage funcionalmente com TLR2 e TLR4. CD14 pode ligar-se aos cristais e promover a inflamação. Além disso, uma interação direta dos cristais de MSU com o colesterol na membrana das células dendríticas, conduz à ativação da quinase Syk (tirosina quinase de baço) intracelular e tem sido implicada tanto na internalização dos cristais como na resposta celular para à ligação dos cristais (NEOGI, 2011; RICHETTE; BARDIN, 2010).

Cristais de MSU fagocitados são detectados no citoplasma levando à montagem do inflamassoma NLRP3 em sinoviócitos do tipo macrófagos. Esta interação entre os cristais e o inflamassoma provoca a ativação da caspase-1, iniciando sua maturação e secreção da citocina IL-1 β . A ligação da IL-1 β com o receptor de IL-1 β desencadeia a transdução do sinal, levando a alterações na expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. Isto, juntamente com outros eventos inflamatórios resultam no recrutamento de neutrófilos e no aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), o qual é o fator determinante da inflamação intensa da gota. Os cristais de MSU podem aumentar os níveis de muitos outros mediadores inflamatórios e receptores pró-inflamatórios através de mecanismos que são dependentes ou independentes de IL-1 β . Ainda, durante um ataque agudo de gota há o aumento bastante acentuado da proteína amielóide sérica A (SAA), uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado que é utilizada como um biomarcador da doença. As concentrações séricas da SAA pode aumentar até 1000 vezes durante um ataque agudo de gota. (MARTINON, et al., 2009; NEOGI, 2011;

SILVA, et al, 2014; HOFFMEISTER, et al., 2014; TREVISAN, et al., 2014; DE BUCK, et al., 2015).

Ataques agudos de gota são de natureza auto-limitante e os mecanismos propostos para sua resolução incluem revestimento de cristais com proteínas protetoras e mudanças no equilíbrio da expressão de citocinas pró-inflamatórias para anti-inflamatórias, são fatores como a mudança nas populações de células dentro da articulação inflamada. O influxo de monócitos ocorre em conjunto com o influxo de neutrófilos. Durante a maturação de macrófagos em resposta aos cristais de MSU, as alterações fenotípicas de pró-inflamatória para anti-inflamatória podem ocorrer, os macrófagos são capazes de liberar mediadores anti-inflamatórios e limpar os neutrófilos apoptóticos, levando à resolução espontânea da inflamação gotosa (RICHETTE; BARDIN, 2010; TERKELTAUB, 2010).

1.4 Apresentação Clínica da Gota

A apresentação clínica mais comum da gota é a artrite monoarticular aguda que é auto-limitada (SMITH, et al., 2011). A gota é normalmente dividida em quatro etapas: hiperuricemia assintomática (1), artrite gotosa aguda (2), gota intercrítica (3) e gota tofácea crônica (4) (DALBETH; STAMP, 2014).

Na fase de hiperuricemia assintomática os níveis séricos de ácido úrico são elevados no entanto os indivíduos não apresentam sintomas clínicos. Fatores desencadeantes induzem a formação de cristais de MSU nas articulações ou tecidos periarticulares de alguns indivíduos hiperuricêmicos, que conduz para a próxima fase da doença.

Na fase de artrite gotosa aguda, a deposição de cristais de MSU resulta em artrite inflamatória aguda auto-limitada intermitente. Esta fase na maioria das vezes começa em uma articulação dos membros inferiores (85-90% dos casos), geralmente a primeira articulação metatarsofalângica. Outras articulações dos pés, tornozelos, joelhos, cotovelos, pulsos e dedos podem ser afetadas. A articulação afetada parece quente, eritematosa, inchada e macia. A gota inflamatória aguda também pode ocorrer em torno dos tecidos macios ou conjuntivos. Crises de gota aguda não tratadas são caracterizadas por dor intensa, que tende a apresentar um pico dentro de 6-72 h, geralmente diminuindo ao longo de 3-10 dias. Apenas um único episódio pode ocorrer em alguns indivíduos, no entanto, os pacientes muitas vezes têm um segundo ataque no prazo de 6 meses a 2 anos.

O estágio intercrítico da gota, ou fase 3, é definido como o período assintomático entre as crises agudas. Os indivíduos podem permanecer hiperuricêmicos e terem ataques mais agudos sem tratamento. Embora clinicamente silenciosa, a doença pode progredir durante o período intercrítico e tofos podem se desenvolver (gota tofácea). Inicialmente, crises de gota aguda são raras e períodos intercríticos são longos. No entanto, com a progressão da doença, erupções agudas aumentam com frequência e os períodos intercríticos podem diminuir. Ataques agudos podem se tornar poliarticulares, aditivos e ascendentes. Além disso, eles tendem a durar mais tempo e a sua gravidade aumenta.

A gota tofácea crônica, último das quatro fases, geralmente ocorre após a gota estar presente há muitos anos e é caracterizada pela artrite destrutiva crônica, que muitas vezes ocorre com alterações

secundárias degenerativas, erosões ósseas e o desenvolvimento de tofos. A gota tofácea desenvolve-se dentro de 5 anos após o início de gota em 30% dos pacientes não tratados. Tofos são frequentemente vistos na hélice da orelha, ao longo dos processos olecranos, nos tendões de Aquiles, no interior e em torno das articulações dos dedos dos pés ou mãos, ao redor dos joelhos e dentro das bursas pré-patelares. Tofos são indolores e raramente infeccionam. No entanto a qualidade funcional relacionada a qualidade da vida pode ser severamente afetada em indivíduos com gota crônica (RICHETTE; BARDIN, 2010).

Embora este sistema de estadiamento amplamente aceito descreve a sintomatologia da gota, ele não captura alguns aspectos chave da base patológica da doença, assim alternativas para o sistema de estadiamento da doença têm sido propostas (DALBETH; STAMP, 2014).

Existem vários critérios de classificação ou regras de diagnóstico para a gota. Recentemente, um grupo internacional de investigadores apoiado pelo Colégio Americano de Reumatologia e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo propuseram critérios novos com alta sensibilidade e especificidade para consideração nos estudos sobre a gota clínica (NEOGI et al., 2015). O critério de entrada requer a ocorrência de pelo menos um episódio em articulações periféricas. Além disso, a presença de cristais de MSU numa articulação sintomática ou tofos são suficientes para considerar o indivíduo como tendo gota. Os novos critérios de classificação incluem:

- Sinais clínicos (padrão de envolvimento articular, características e evolução no tempo dos episódios sintomáticos);
- Exames laboratoriais (ácido úrico e aspirado líquido sinovial);

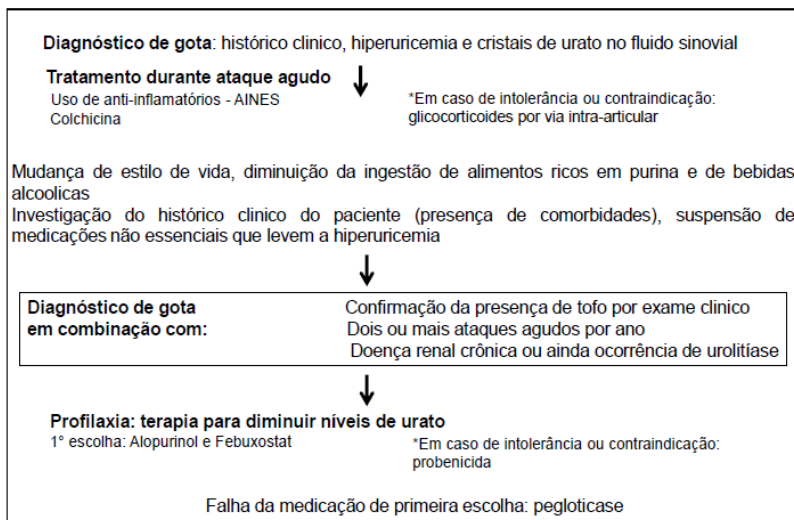
- Diagnóstico por imagem (um sinal de duplo contorno no ultrassom).

1.5 Terapia Farmacológica e Não-Farmacológica

A gota aguda é reconhecida como uma das experiências mais dolorosas. Portanto, o tratamento de um ataque agudo deve ser iniciado o mais cedo possível após o diagnóstico inicial ou assim que os primeiros sintomas de alerta sejam percebidos em um paciente com gota reconhecida (REES et al., 2014). Educação na alimentar e mudança no estilo de vida são objetivos do tratamento bem como a gestão de comorbidades. As medidas gerais para lidar com ataques de gota aguda incluem a alteração da dieta, a interrupção da ingestão de álcool e a modificação de outros fatores precipitantes, tais como uso de diuréticos (SMITH et al., 2011).

Diretrizes têm sido propostas para melhorar o tratamento de gota. O Colégio Americano de Reumatologia apresentou recomendações não-farmacológicas e farmacológicas sistemáticas para o tratamento eficaz de gota, com uma relação risco/benefício aceitável (KHANNA et al., 2012 a,b). A seguir, quatro domínios específico na gestão de gota serão descritos: (1) terapia de redução de urato (TRU), (2) gestão da artrite gotosa tofácea crônica, (3) gestão de artrite gotosa aguda com agentes analgésicos e anti-inflamatórios, e (4) profilaxia farmacológica de ataques inflamatórios de artrite gotosa (KHANNA et al., 2012 a,b) (Quadro 1).

Quadro 1 – Terapia empregada para o tratamento da gota demonstrando a sequência de medidas profiláticas e farmacológicas a serem tomadas após o diagnóstico de gota.



Silva, 2014, baseada em Khana et al. (2012 a), Arthritis Care and Research 64:1431-1446 e Cronstein (2013), J Clin Rheumatol, 19:19-29.

A terapia com inibidores da xantina oxidase, com o alopurinol ou febuxostat, é recomendada como o primeira linha farmacológica em pacientes com gota. O nível de urato de soro deve ser suficientemente reduzido para melhorar os sinais e sintomas de gota, com um alvo mínimo de <6 mg/dL e um objetivo geral de <5 mg/dL (KHANNA et al., 2012 a,b).

A combinação da terapia oral com um inibidor da xantina-oxidase e um agente uricosúrico é apropriado quando o nível de urato no soro não é alcançado tanto com a dosagem adequada de um inibidor de xantina-oxidase. Agentes uricosúricos (probenecida e benzobromarona)

aumentam a excreção renal de ácido úrico, principalmente através da inibição da reabsorção de urato pelas células epiteliais do túbulo proximal renal. Probenecida é recomendada como a primeira escolha entre os agentes uricosúricos (KHANNA et al., 2012 a,b).

Em pacientes com gota grave que são refratários ou intolerantes ao uso da terapia para diminuição de urato por via oral, uricases são apropriadas. Nos seres humanos, uricases oxidam o ácido úrico a alantoína, um metabólito altamente solúvel em água. A perfusão intravenosa de pegloticase reduz não só os níveis de ácido úrico sérico como também os tofos. A dose de pegloticase recomendada para adultos é de 8 mg a cada 2 semanas, que é administrado por via intravenosa durante pelo menos 2 h. Os pacientes devem receber um anti-histamínico e um corticosteróide antes da infusão para evitar possível anafilaxia. Anticorpos antipegloticase podem ser produzidos, e estes reduzem a eficácia de pegloticase. Os efeitos adversos mais comuns de tratamento incluem reação a infusão de pegloticase, nefrolitíase, artralgia, anemia, dispneia, dor de cabeça, espasmos musculares, náuseas, e febre. Esta terapia é contra-indicada em pacientes com deficiências de glicose-6-desidrogenase (KHANNA et al., 2012 a,b).

Um ataque agudo de artrite gotosa deve ser tratado com terapia farmacológica, iniciado no prazo de 24 h do início dos ataques. Estabelecida a diminuição de ácido úrico sérico por via farmacológica esta deve ser continuada, sem interrupção, durante um ataque agudo de gota. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), corticosteroides ou colchicina oral são opções de primeira linha para o tratamento da gota aguda, e certas combinações podem ser empregadas para ataques graves ou refratários. Anti-inflamatórios não esteroidais são inibidores das

enzimas ciclo-oxigenase, que reduzem a produção de prostaglandinas, que são mediadores críticos de dor e inflamação. Vários anti-inflamatórios não esteroidais são ativos contra ataques de dor aguda e podem ser administrados quer por via intravenosa ou por via oral.

A profilaxia farmacológica anti-inflamatória é recomendada para todos os pacientes com gota quando TRU é iniciada, e deve ser mantida se houver qualquer evidência clínica da continuação da atividade da gota ou se o alvo TRU ainda não tiver sido alcançado. A terapia com anti-inflamatórios não esteroidais em doses baixas doses é uma escolha apropriada para primeira linha de profilaxia contra ataques de gota, a menos que haja uma falta de tolerância ou contraindicação médica. A administração de colchicina oral é uma profilaxia de primeira linha adequada para ataques de gota, com ajuste na dose adequada aos pacientes com doença renal crônica, interações medicamentosas e alimentares, a menos que haja falta de tolerância ou contraindicação médica. Além disso, a colchicina tem sido aprovada para o tratamento de crises de gota em doentes adultos. No entanto, deve ser evitada ou utilizada com uma dose baixa em idosos e em indivíduos com insuficiência renal, disfunção hepática, sintomas gastrointestinais conhecidos, miotoxicidade e discrasias sanguíneas. O seu principal mecanismo de ação na gota acredita-se ser através da sua ligação a beta-tubulina em neutrófilos. Colchicina pode causar intoxicação, com uma fase gastrointestinal precoce e uma fase tardia de disfunção de múltiplos órgãos. É crucial reconhecer o envenenamento por colchicina, pois ela é associada a uma alta taxa de mortalidade se não diagnosticada (KHANNA et al., 2012 a,b).

Quando o uso de NSAIDs ou colchicina é mal tolerado, não apropriado, ou contra-indicado, glicocorticóides ou corticotrofina podem

ser administrados oralmente ou entericamente, dependendo da situação clínica. Se uma única articulação está envolvida, a aspiração intra-articular do fluido sinovial seguida da injeção subsequente de um corticosteróide (metilprednisolona ou triamcinolona) parece ser eficaz. Pacientes com gota geralmente não relatam efeitos adversos graves causados por uso de esteróides de curto prazo. Além disso, alguns relatos de casos e estudos-piloto têm demonstrado que inibidores e antagonistas da IL-1 β podem ser benéficos para pacientes com gota, uma vez que bloqueiam a ação de IL-1 β , um produto do inflamassoma NLRP3 ativado. Em um estudo randomizado, a dor da artrite gotosa aguda foi significativamente menor com o canacinumab (anticorpo monoclonal anti-IL-1 β totalmente humano) do que com um glicocorticóide intramuscular. No entanto, são necessárias mais provas para confirmar a eficácia dos antagonistas e inibidores de IL-1 β em pacientes com gota refratária (KHANNA et al., 2012 a,b).

A terapia não-farmacológica coadjuvante da gota não tem sido bem estudada. Relatos e estudos-piloto foram publicados, no entanto, não há nenhuma evidência convincente. As potenciais opções terapêuticas são a acupuntura, eletro acupuntura, gelo, repouso e terapia de spa. A qualidade dos cuidados em pacientes com gota pode, potencialmente, ser melhorada através de uma melhor educação centrada na gota. Gestão de baixa qualidade da gota parece ser relativamente comum, incluindo atraso significativo no início do tratamento, uso potencialmente inadequado de colchicina, anti-inflamatórios não esteroidais, alopurinol, e altas taxas de interrupção da medicação. A educação do paciente deve enfatizar a necessidade estrita dos regimes de medicação (KHANNA et al., 2012 a,b).

Apesar do grande aparato farmacológico disponível para o manejo da hiperuricemia e de um ataque agudo de gota, ainda não há nenhum medicamento ou esquema terapêutico capaz de tratar ou prevenir todos os sinais e sintomas durante um ataque agudo. A maioria dos medicamentos e esquemas terapêuticos utilizados na clínica apresentam efeitos adversos que levam à descontinuação do tratamento, como por exemplo, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais e colchicina. Vale ressaltar que os recursos terapêuticos mais avançados como os inibidores da IL-1 β são de alto custo e não são eficazes para todos os pacientes.

1.6 Estresse Oxidativo e Gota

Os mecanismos celulares e moleculares de um ataque agudo de gota ainda necessitam de maiores informações para sua compreensão. O estudo do envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) na gota tem se tornado um alvo promissor, pois as vias de sinalização do processo inflamatório levam à indução de ROS pelo MSU. Zamudio-Cuevas et al. (2016), mostraram que os cristais de MSU induzem a liberação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) em sinoviócitos humanos e oxidam proteínas, alterando o estado oxidativo celular do retículo endoplasmático, resultando em apoptose dos sinoviócitos.

As reações redox (transferência de elétrons) são um componente vital de muitos processos fisiológicos naturais. Como resultado, o corpo humano está constantemente exposto a numerosos agentes oxidantes e produtos eletrofílicos. O desequilíbrio entre os principais processos bioquímicos que levam à produção de agentes oxidativos e espécies eletrofílicas, e os responsáveis pela remoção destas substâncias químicas é referida como estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser causado

por excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) gerados a partir de fontes exógenas e endógenas. Fontes oxidantes exógenas incluem substâncias químicas cancerígenas, substâncias cancerígenas ambientais, radiação etc. Fontes oxidantes endógenos incluem produtos químicos envolvidos em processos intracelulares, tais como sinalização celular, processos metabólicos e inflamação. ROS incluem superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH\cdot$) e RNS incluem o óxido nítrico ($NO\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (DE BONT; LAREBEKE, 2004; SEDELNIKOVA et al., 2010).

ROS também são gerados no corpo como resultado de processos fisiológicos naturais, tais como a respiração aeróbica nas mitocôndrias e durante as respostas inflamatórias que protegem o corpo de substâncias e organismos patogênicos, em alguns casos, servindo como moléculas de sinalização. Dado que as condições de estresse oxidativo sustentado pode causar danos ao DNA e a estruturas celulares vitais, o corpo humano desenvolveu mecanismos antioxidantes e citoprotetores contra vários tipos de estresse oxidativo (SEDELNIKOVA et al., 2010; LI et al., 2013)

O sistema de defesa antioxidante é o principal mecanismo de proteção usado pelas células de defesa frente a agentes oxidantes e eletrofílicos. O sistema antioxidante pode ocorrer a partir de fontes endógenas ou a partir da nossa dieta e precisam ser reabastecidas ou regeneradas para oferecer maior proteção. Exemplos destes antioxidantes incluem glutathiona, ácido ascórbico, vitamina E entre outros. A glutathiona por estar presente em todas as células, normalmente utilizada em estudos pré-clínicos para avaliar o estado de homeostase ou o desequilíbrio redox

dos sistemas biológicos. Além disso, existem várias enzimas antioxidantes que estão envolvidas nas mais eficazes desintoxicações catalíticas de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. Estes incluem enzimas NAD(P)H, superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), a glutathione-peroxidase (GPx), a heme-oxigenase-1 (HO-1), glutamato-cisteína ligase (GCL), catalase (CAT), e tioredoxina (TRX). A enzima GCL é uma enzima muito importante envolvida no processo desintoxicação do organismo, uma vez que faz a regulação da velocidade da síntese de glutathione, um composto antioxidante (DINKOVA-KOSTOVA, 2008; LYAKHOVICH et al, 2006).

Muitas destas enzimas antioxidantes e citoprotetoras são controladas pela mesma via de transcrição de três componentes: o elemento de resposta antioxidante (ARE), o fator nuclear eritróide 2 relacionado com o fator 2 (Nrf2), e Kelch como proteína associada a ECH 1 (Keap1). O ARE é um elemento de sequência cis-reguladora, que se encontra na região promotora de numerosos genes que codificam enzimas de desintoxicação e proteínas citoprotetoras. Sob condições de stress oxidativo, estabiliza o Nrf2 e o transloca para o núcleo, levando à ativação de genes alvo. O Nrf2 por sua vez é um fator de transcrição essencial para a manutenção da homeostase celular. Ao ser fosforilado, o Nrf2 a leva a transcrição de enzimas de fase II, que são responsáveis pela ação antioxidante de compostos como o triterpeno natural ácido oleanólico e o triterpeno sintético o CDDO-Me (ABED et al., 2015; LIBY; YORE; SPORN, 2007).

O Keap1 possui função reguladora, controlando o nível do estado estacionário de Nrf2 com base na condição redox da célula, ou seja, atua

como um agente repressor quando o estado redox está em homeostase. Em condições basais, Nrf2 está ligado, à Keap1 (ABED et al., 2015).

Caracterizada por um intenso processo inflamatório, a gota apresenta também um alto nível de estresse oxidativo. O estresse oxidativo na gota é gerado pela formação de ROS bem como de citocinas pró-inflamatórias. Uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio na gota são os neutrófilos e macrófagos que se infiltram na membrana sinovial. Sabe-se que estas células expressam uma quantidade de antioxidantes como SOD e catalase, em contraste, sinoviócitos produzem maiores quantidades de SOD, glutathione peroxidase e catalase. É possível que a elevada produção de enzimas antioxidantes seja devida à ativação do Nrf2 por ROS (ZAMUDIO-CUEVAS et al., 2015).

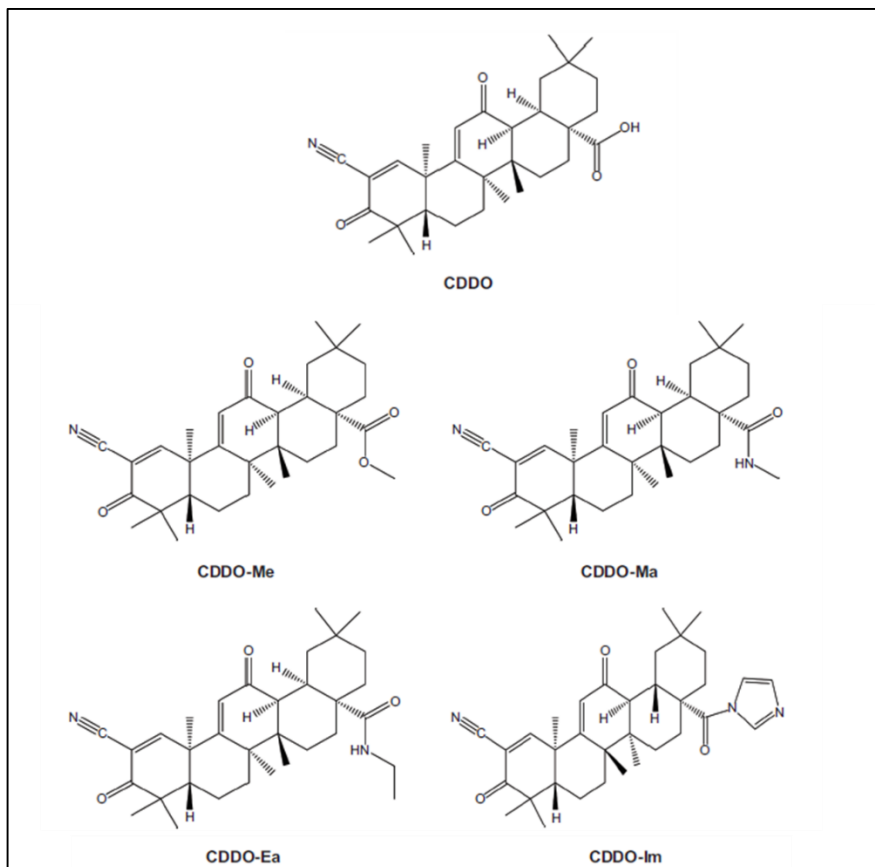
Além disso, TREVISAN et al., (2014) demonstraram que a produção de H_2O_2 apresenta um papel relevante na nocicepção e também na inflamação observada em modelos de ataque agudo de gota. Já o bloqueio da produção de H_2O_2 utilizando a catalase reduz o conteúdo de IL-1 β , a atividade da mieloperoxidase e o acúmulo de neutrófilos no espaço sinovial após a administração intra-articular de MSU evidenciando assim o envolvimento de ROS no processo agudo de gota.

A utilização de um agente capaz de combater os danos oxidativos ou que aumente as defesas antioxidantes frente ao MSU poderia ser a chave ou um adjuvante relevante no tratamento de um ataque agudo de gota. O elevado número e a grande diversidade dos metabólitos dos vegetais despertou o nosso interesse, pois estes são fontes promissoras de novas moléculas. Alguns metabólitos sintetizados por plantas possuem ação antioxidante, protegendo as células e tecidos dos danos oxidativos.

1.7 Triterpenos e CDDO-Me

As plantas sintetizam uma grande quantidade de metabólitos secundários, dentre eles pode-se destacar os triterpenos. Os triterpenos são produzidos a partir da ciclização do esqualeno e são utilizados pelas plantas como meio de defesa e pelo homem como solução para o tratamento de doenças. Mais de 20 000 triterpenos são conhecidos por ocorrerem na natureza, dentre eles destacam-se o ácido oleanólico e o ácido ursólico. Os triterpenos têm chamado atenção por apresentarem atividades anti-inflamatórias e antitumorogênicas. Modificações em suas estruturas foram realizadas a fim de melhorar significativamente sua atividade biológica resultando em derivados sintéticos conhecidos como CDDO. Mais de 300 novos derivados do ácido oleanólico e do ácido ursólico foram sintetizados no Dartmouth College, EUA, dentre eles destacam-se o 2-ciano-3,12-dioxolane-1,9-dien-28-óico (CDDO) e seus derivados, tais como metiléster de CDDO (CDDO-Me), a metilamida de CDDO (CDDO-Ma), a acetilamida de CDDO (CDDO-Ea) e imidazolida de CDDO (CDDO-Im) (Figura 1). Estes triterpenos sintéticos são potentes inibidores da síntese de enzimas inflamatórias como a sintase de óxido nítrico induzível (NOSi) e da cicloxigenase. O CDDO e o seu éster metílico (CDDO-Me), estão atualmente na Fase I de ensaios clínicos para o tratamento de leucemia, tumores sólidos, linfomas, doença renal crônica e hipertensão arterial pulmonar (PHILLIPS, 2006; LIBY, 2015; WANG, 2014; WONG, 2016).

Figura 1. Estrutura química do CDDO, CDDO-Me, CDDO-Ma, CCDO-Ea, e CDDO-Im.



Baseado em Wang et al (2014), Drug Design, Development and Therapy 8:2075–2088.

Um levantamento realizado por WU e colaboradores; em 2014, demonstrou que estudos recentes com o CDDO-Me indicam que ele leva à inativação da sinalização STAT-3, inibe o transporte mitocondrial de elétrons via perturbações na integridade da membrana mitocondrial,

induz a apoptose de células cancerosas por perturbar o equilíbrio redox intracelular, inibe a ativação da via NF-KB, protege contra a inflamação causada por lipopolissacarídeo através da ativação da via do Nrf2/Keap1. Estudos em humanos demonstraram que o CDDO-Me foi eficaz em aumentar a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes com doença renal crônica e diabetes do tipo 2 em ensaio clínico de fase II.

AULETTA e colaboradores, em 2010, constataram que o pré-tratamento com CDDO-Me melhorou significativamente a sobrevivência em camundongos desafiados com LPS. CDDO-Me não só prolongou a sobrevivência de camundongos como diminuiu os níveis circulantes de IL-6, IL-12, IL-17, e IL-23, sem alterar o número ou subtipos de células do sistema imunológico.

Segundo LIBY, YORE e SPORN, (2014) os triterpenos sintéticos como o CDDO-Me podem proteger as células e os tecidos do estresse oxidativo através do aumento da atividade de transcrição de Nrf2. Muitas formas de estresse aumentam a formação de ROS. Em doses baixas, as ROS podem induzir uma resposta protetora através da ativação do fator de transcrição Nrf2, que por sua vez induz a formação de enzimas citoprotetoras (enzimas de fase II). Contudo doses elevadas destes fatores podem causar dano celular grave e morte. Os triterpenos sintéticos CDDOs, bem como o CDDO-Me, são agentes citoprotetores úteis, pois em doses extremamente baixas podem induzir a síntese de enzimas de fase II que protegem contra os efeitos nocivos e a morte causadas por ROS, RNS e eletrófilos. Sob condições fisiológicas o Nrf2 é sequestrado pelo inibidor KEAP1 e é transcricionalmente inativado. Na presença de ROS, triterpenos e eletrófilos o KEAP1 é dissociado. A atividade da via Nrf2-KEAP1 também é regulada por fosforilação e ubiquitinação, mas os

detalhes moleculares desses regulamentos ainda estão sob investigação intensiva (LIBY, YORE e SPORN, 2014).

Uma revisão feita por Wang et al., (2010), compilou os estudos a respeito do possível mecanismo de ação do CDDO-Me, onde é possível observar que as triagens iniciais têm mostrado que o CDDO-Me se liga ao receptor peroxissoma gama ativado por proliferador (PPAR- γ) e exibe atividade agonista parcial e antagonista. No entanto, muitas das ações dos triterpenos sintéticos ocorrem independentemente deste receptor nuclear. Outros alvos moleculares diretos incluem Keap1 e IKK β . A estrutura de CDDO-Me é semelhante à das prostaglandinas ciclopentenônicas e da 15-deoxi-prostaglandina- Δ , que são os ativadores endógenos de Nrf2, levando a desempenhar um papel importante na resolução da inflamação e suprimindo a atividade do NF- κ B. A ligação do CDDO-Me ao Keap1 interrompe seus resíduos de cisteína críticos, levando à liberação do Nrf2, o que dificulta a sua ubiquitinação e, finalmente, leva à estabilização e translocação nuclear de NF- κ B. No núcleo, Nrf2 ativa a transcrição dos genes de resposta de fase II, que conduzem a uma resposta antioxidante e anti-inflamatória coordenada. CDDO-Me também pode se ligar à Cys-179 e inibir a ativação do NF- κ B. A ligação de CDDO-Me ao IKK β impede a liberação do NF- κ B a partir do seu complexo ligado com I κ B no citosol, inibindo assim a ativação do NF- κ B e das vias pró-inflamatórias.

Hong et al., (2012), a partir da cromatografia de massa e líquida desenvolveram uma metodologia para determinar a farmacocinética do CDDO-Me em 47 pacientes com tumores linfóides. O comportamento farmacocinético da formulação de CDDO-Me testada foi caracterizado por uma absorção oral lenta e saturável, uma meia-vida relativamente

longa. O tempo médio até à concentração plasmática máxima foi de $4,1 \pm 3,4$ horas com a dose de 900 mg. As médias das concentrações mínimas e máximas no estado estacionário do CDDO-Me no plasma, indicaram que o regime de dosagem de uma vez por dia mantém eficaz os níveis plasmáticos de droga dentro de um intervalo relativamente estreito. Por possuir uma meia vida longa, o estudo concluiu que o regime de dosagem de uma vez por dia é adequado para estudos.

Com base no exposto, a investigação do efeito antinociceptivo e a ação anti-inflamatória do CDDO-Me no processo inflamatório doloroso de um ataque agudo de gota torna-se relevante diante da necessidade de novas abordagens terapêuticas para o manejo da dor e da inflamação na gota. Até o momento não há trabalhos publicados que evidenciem o efeito do triterpeno sintético CDDO-Me nesta patologia.

1. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do CDDO-Me na nocicepção e na inflamação de camundongos submetidos ao modelo agudo de gota.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Verificar se o pré-tratamento com o CDDO-Me é capaz de prevenir a nocicepção e a inflamação em camundongos submetidos ao modelo agudo de gota;
- b. Determinar os níveis de marcadores inflamatórios séricos e articulares, bem como os níveis de marcadores oxidativos no lavado articular;
- c. Comparar o efeito do CDDO-Me no modelo de ataque agudo de gota com um AINE já utilizado na clínica;
- d. Verificar os níveis de urato sérico, o consumo de água ou ração e o peso corporal dos animais após o tratamento com CDDO-Me;
- e. Verificar o envolvimento da via de sinalização Nrf2/Keap1 no efeito do CDDO-Me em um modelo agudo de gota.

2. Hipótese

O pré-tratamento com o triterpeno CDDO-Me previne a nocicepção e a inflamação associado ao ataque agudo de gota em camundongos.

3. Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos do tipo Swiss com idade entre 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acondicionados em grupos em caixas de acrílico e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental em temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro e 12 h escuro com acesso à água e ração *ad libitum*. Para a formação dos grupos experimentais, os animais foram distribuídos nos grupos experimentais de forma randomizada e aclimatados por pelo menos 1 hora antes da realização dos testes comportamentais.

O número de animais utilizados durante todo o protocolo experimental foi calculado de forma a reduzir o número de animais utilizados no final do estudo. O n foi calculado baseado no desfecho primário para os testes comportamentais (von Frey) e no menor número de amostras necessárias para as dosagens bioquímicas. Para o cálculo da amostragem, utilizou-se os seguintes conjunto de dados: desvio padrão (0,3889), diferença a ser detectada (0,6352), nível de significância (5%), poder do teste (90%), teste de hipótese (bicaudal). Para a detecção do número de amostras foi utilizado o teste t de Student, e o tamanho da amostra foi de 8 animais por grupo.

Os experimentos foram conduzidos após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o protocolo n° PP00872 (Anexo I) e realizados de acordo com as diretrizes Animal Research, Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) (McGRATH, 2010). Para a realização da eutanásia os animais foram

anestesiados com cetamina e xilazina, após a verificação de analgesia profunda realizou-se o deslocamento cervical.

4.2 Drogas e Tratamento

Para estudar a ação anti-hiperalgésica e anti-inflamatória do ácido 2-cyano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic metil éster (CDDO-Me), os animais foram tratados com CDDO-Me na dose de 1 mg/Kg durante 3 dias, uma vez ao dia (YATES, 2007) previamente a administração de MSU. Os animais do grupo controle-positivo receberam 10 mg/Kg de indometacina 1 hora antes da indução do ataque agudo de gota (WATANABE, 2008), e os animais do grupo controle receberam apenas o veículo (água MiliQ). O tratamento foi realizado via oro-gástrica para todos os grupos.

CDDO-Me foi obtido da Cayman Chemical (Michigan, USA) e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparação da solução de estoque. A solução de uso foi posteriormente dissolvida em água MiliQ no dia do tratamento, concentração final de DMSO foi de 0,05%. A indometacina foi obtida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), no dia do tratamento foi diluída em etanol e posteriormente em água MiliQ, concentração final de etanol foi de 1,5%.

4.3 Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi executado como descrito a seguir (Figura 1). Para a determinação da dose e do tempo em que as coletas seriam realizadas nas dosagens dos parâmetros inflamatórios, realizou-se uma curva de dose resposta e um decurso temporal. Antes do início do tratamento os animais passaram por testes comportamentais (hiperalgesia

mecânica, hiperalgesia espontânea) e aferição do diâmetro articular a fim de avaliar os níveis basais e realizar a distribuição de forma randomizada dos animais nos quatro grupos experimentais (controle não tratado, veículo, CDDO-Me e indometacina). Nos dias 0, 1 e 2 os animais do grupo veículo e do grupo CDDO-Me (0,3; 1 ou 3 mg/Kg) foram tratados via oro gástrica uma vez ao dia. Os animais do grupo indometacina receberam o tratamento uma única vez, uma hora antes da indução da gota. E o grupo de animais não tratados não recebeu nenhum tratamento.

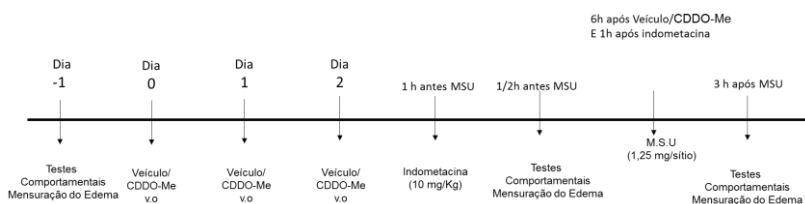
As doses de CDDO-Me testadas foram baseadas no estudo publicado por Yates e colaboradores, (2007). Neste estudo a atividade farmacodinâmica do CDDO-Me foi examinada como indutor de genes citoprotetores em tecidos murinos. A dose de 1mg/Kg durante 3 dias v.o. foi suficiente para aumentar o marcador farmacodinâmico utilizado - NQO1, indicando sinalização via Nrf2 para a ativação de genes citoprotetores, essa dose e período de tratamento foi capaz de ativar NQO1 tanto no intestino delgado (local de absorção) quanto em tecidos mais distantes como pulmão e cérebro. Para a construção de uma curva dose-resposta é necessário no mínimo de três doses (RANG, 2007), a fim de comparar a eficácia de diferentes doses e avaliar a dose apropriada. Com base no exposto foi escolhida uma dose menor e outra maior a utilizada por Yates, et al. (2007) no presente estudo.

Durante o tratamento (dias 0, 1 e 2) os animais foram pesados e o consumo de ração e água por grupo foi determinado. A indução do ataque agudo de gota foi realizado através da administração de cristais de MSU (1,25 mg/articulação, com comprimento médio de $12 \pm 2 \mu\text{m}$), proveniente do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM)/UNESC da professora Dra. Gabriela Trevisan, suspensos em

20 µl de PBS estéril e injetados na articulação tíbio-tarsal de camundongos anestesiados com isoflurano no dia 2. A indução da gota nos grupos veículo e CDDO-Me ocorreu seis horas após o último tratamento e a indução no grupo indometacina ocorreu 1 h após o tratamento.

No dia 2, os testes comportamentais e a medida do diâmetro articular foram realizados novamente antes da indução da artrite gotosa a fim de verificar o efeito dos tratamentos sobre parâmetros nociceptivos e diâmetro articular dos animais. Para realização da curva de dose, as medidas foram realizadas pré-tratamento, pós-tratamento e 3 horas após a administração dos cristais de MSU. Para a realização do decurso temporal foram realizadas medidas pré-tratamento, pós-tratamento, 3, 6, e 24 horas após a administração do MSU.

Figura 2: Esquema representativo do protocolo experimental.



Para a coleta das amostras repetiu-se o protocolo experimental acima com os grupos não tratado, veículo, CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias) e indometacina (10 mg/Kg). As coletas de sangue, lavado do articulação e tecido articular foram realizadas 3 horas após a indução da gota. Os animais foram anestesiados e procedeu-se à perfusão transcárdica com solução salina gelada. Utilizou-se as amostras para a determinação de

ácido úrico (AU), interleucina – 6 (IL-6), fator amielóide sérico (SAA), contagem de leucócitos, mieloperoxidase (MPO), proteínas, glutathiona, glutamato cisteína ligase, Nrf2 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

4.4 Medidas de Nociceção e Inflamação

Os animais expostos ao protocolo de um ataque agudo de gota foram submetidos aos seguintes testes comportamentais e mensuração do diâmetro articular para avaliar a nociceção e o edema respectivamente:

- Hiperalgesia Mecânica – teste de von Frey método *up-down*: a avaliação da hiperalgesia mecânica baseia-se na metodologia descrita por Chaplan *et al*, (1994) com modificações. Os animais foram acondicionados previamente durante 1 h para ambientação em caixas de acrílico transparentes, sobre uma plataforma elevada com o assoalho em grade. Com o animal parado filamentos de von Frey de diferentes forças foram aplicados individualmente e sequencialmente na superfície plantar da pata traseira. O levantamento da pata durante a aplicação do filamento era tido como uma resposta positiva frente ao estímulo mecânico aplicado e em 30 segundos um novo filamento de força menor ao anterior era aplicado. Quando uma resposta positiva não era detectada, um novo filamento de força maior ao anterior foi utilizado. Esse paradigma continuou até que seis filamentos tivessem sido utilizados ou até que quatro resposta positivas ou negativas consecutivas tivessem sido obtidas. O resultado final deste teste foi expresso como 50% do limiar mecânico de retirada da pata, calculado conforme descrito por Dixon (1980).

- Comportamento Nociceptivo Espontâneo (Escore): a avaliação do comportamento nociceptivo (escore) baseia-se numa adaptação do método utilizado por CODERRE e WALL, (1988). Os

animais foram alocados da mesma forma citada para o teste de hiperalgesia mecânica para permitir uma visão clara das patas e da pressão que o animal aplicava na pata que recebeu a injeção de MSU. A observação ocorreu durante um período mínimo de 5 min. Os escores foram avaliados e classificados de acordo com a tabela 1A (Escore Parado) e a alteração da marcha produzida pela injeção de urato de sódio foi avaliada e classificada de acordo com escala de pressão apresentados na tabela 1B (Escore Caminhando) através do caminhar em uma superfície plana. Os resultados são expressos através do somatório dos escores atribuídos no Escore Parado e Caminhando.

Tabela 1: Escala do comportamento nociceptivo do animal parado (A) e caminhando (B)

(A)	0 – pressão normal da pata;
	1 – pressão das pata reduzida: pata totalmente no chão, porém com dedos não bem distribuídos;
	2 – pressão da pata reduzida: pata enrolada ou apenas parte da pata no chão;
	3 – pata elevada: a pata não toca nenhuma superfície.
(B)	0 – marcha normal;
	1- Ligeiro coxear;
	2- Leves toques da pata no chão durante a marcha;
	3- Marcha mole (coxear bastante acentuado).

4.5 Mensuração do diâmetro articular

A mensuração do diâmetro articular, deu-se pela medida do diâmetro da articulação tíbio-tarsal com o auxílio de um paquímetro eletrônico. Antes da indução do ataque agudo de gota os animais tiveram o diâmetro da articulação aferida, foram tomadas três medidas e calculou-se a média, sendo este valor denominado valor basal. Três horas após a indução da gota, o diâmetro articular foi aferido novamente por três vezes, calculado a média e os resultados são apresentados como valor em milímetros da média obtida em 3 h subtraída do valor médio basal (Resultado = média em 3 h/média basal) (CAO et al; 1998).

4.6 Coleta de Amostras

Após a realização dos testes comportamentais e mensuração do diâmetro articular realizou-se a coleta das amostras para dosagem dos parâmetros inflamatórios. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina. Primeiramente preparou-se uma mistura de 150 µl de cetamina e 50 µl xilazina em 800 µl de solução fisiológica a 0,9%, os animais foram pesados e a administração foi de 10 µl da mistura de anestésicos para cada 1 g de peso corporal. Antes do início da coleta das amostras os animais tiveram seus reflexos testados e o início do procedimento ocorreu após a verificação da ausência total de reflexos, indicando anestesia profunda.

Os animais tiveram seu coração exposto, através da abertura da caixa torácica para a coleta de sangue por punção cardíaca, em seguida procedeu-se perfusão com solução salina gelada. Finda a perfusão, procedeu-se então o lavado sinovial e coleta da articulação.

O sangue coletado foi centrifugado a 2900 x g por 5 minutos a temperatura ambiente para separação do soro. O soro foi aliquotado para dosagem de SAA, AU e IL-6.

4.7 Determinação de Parâmetros Inflamatórios

4.7.1 Dosagem de SAA

A determinação da atividade da proteína amielóide sérica A (SAA) foi realizada utilizando kit comercial (Tridelta Development Ltda, Ireland), seguindo-se as instruções do fabricante e leitor de microplacas com capacidade de medição a 450 nm com uma referência a 630 nm. O ensaio SAA baseia-se no método de imunoabsorção enzimática (ELISA). O princípio da metodologia baseia-se na utilização de soro de camundongos que foi incubado em micro-poços a 37°C em conjunto com um anticorpo marcado com peroxidase anti-SAA. Qualquer SAA presente é capturado entre a microplaca revestida e o anticorpo marcado. A placa é então lavada manualmente. A seguir à adição de tetrametilbenzidina (TMB), um produto azul é gerado em proporção direta com a quantidade de SAA presente na amostra. A reação é então parada com a adição do reagente de paragem. Os resultados são interpretados através da interpolação de uma curva padrão através de ensaio colorimétrico. Todos os resultados foram expressos em µg/ml.

4.7.2 Dosagem de Ácido Úrico

Para determinar a quantidade de ácido úrico sérico utilizou-se kit comercial (Labtest, Lagoa Santana, MG, Brasil) e leitor de placas Elx-800 (Bio-Tek Instruments, ICN, U.S.A) com capacidade de medição em

520 nm, seguindo as instruções do fabricante. A dosagem de ácido úrico baseia-se na reação de Trinder. O ácido úrico é oxidado pela uricase a alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase, reage com o DHBS (3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato) e a 4-aminoantipirina, formando o cromógeno antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra. Os resultados são expressos em mg/dL.

4.7.3 Dosagem de IL-6

A determinação dos níveis séricos de IL-6 foi realizada através de kit comercial (PreproTech, Rock Hill, U.S.A), seguindo as instruções do fabricante. O ensaio baseia-se no método de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo sanduíche. A placa foi preparada com o anticorpo de captura e incubada *overnight*. No outro dia as amostras foram adicionadas, bem como o anticorpo de detecção e a avidina-HRP. Utilizou-se o 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) como substrato. O desenvolvimento da cor foi monitorada em um leitor de placas do tipo TECAN Infinity M200 com comprimento de onda 405 nm e correção de 650 nm a cada 5 minutos durante 60 minutos. Os resultados foram interpretados através da interpolação de uma curva padrão através de ensaio colorimétrico. Todos os resultados foram expressos em ng/mL de proteína.

4.7.4 Contagem Total de Leucócitos

Para a contagem total de leucócitos na cavidade articular, procedeu-se a abertura da cavidade articular com o auxílio de um bisturi seguida da lavagem articular com PBS e o auxílio de uma pipeta (2,5 µl por oito vezes). As amostras foram centrifugadas a 12 000 x g por 5 minutos à 4 °C. Coletou-se o sobrenadante para dosagem de MPO. Ressuspendeu-se o pellet em líquido de Turk. A leitura do número de leucócitos foi realizada no pellet ressuspenso em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico no aumento de 40x.

4.7.5 Dosagem de Mieloperoxidase

Para determinar a quantidade mieloperoxidase no lavado sinovial, utilizou-se a metodologia desenvolvida por SUZUKI, (1983) com modificações. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado a cada poço 10 µl do sobrenadante do lavado articular, 200 µl de tampão acetato (8mM, pH 5,4) e 40 µl de TMB (18,4 mM). Seguiu-se de incubação a 37°C por 3 min. Parou-se a reação em gelo com 30 µl de ácido acético. Utilizou-se leitor de placas Elα-800 (Bio-Tek Instruments, ICN, U.S.A), no comprimento de onda 630 nm para ler as amostras. Os resultados são expressos em D.O./mg de proteína (densidade óptica por miligrama de proteínas).

4.8 Dosagem de Proteínas

A determinação dos níveis de proteína no sobrenadante do fluído sinovial e homogenato articular foi realizado pelo método de BRADFORD (1976). Resumidamente, em uma placa de 96 poços adicionou-se 10 µl de amostra (diluída 1:10) a cada poço e 190 µl de

reagente de Bradford. Incubou-se por 10 minutos no escuro em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas Elα-800 (Bio-Tek Instruments, ICN, U.S.A) em 594 nm. Os resultados foram interpretados através de ensaio colorimétrico e pela equação da reta obtida através da interpolação de uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Todos os resultados foram expressos em mg/ml.

4.9 Extração Nuclear

Para dosagem do Nrf2, realizou-se a extração nuclear de acordo com kit comercial (Cayman Chemical Company, Michigan, U.S.A). Resumidamente homogeneizou-se a articulação com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter em 500 µl de tampão hipotônico suplementado com ditioneitol (DTT) e Nonidet-40 (NP-40). Incubou-se em gelo e após centrifugou-se a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante continha a fração citosólica. O precipitado foi ressuspenso em 500 µl de tampão hipotônico e incubado novamente, após adicionou-se 50 µl de NP-40. Centrifugou-se novamente a 14 000 x g durante 30 segundos a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para o tubo que continha a fração citosólica. O sedimento foi ressuspenso com 100 µl de tampão de extração incubado e centrifugado. O sobrenadante continha o fração nuclear. A fração citosólica foi utilizada para a dosagem de IL-1β e a fração nuclear para a dosagem de Nrf2. Ambas frações tiveram a proteína dosada pelo método de Bradford.

4.10 Dosagem de Nrf2

A dosagem de Nrf2 foi realizada em extrato nuclear. Utilizou-se um kit comercial (Cayman Chemical Company, Michigan, U.S.A) para a dosagem. Resumidamente o kit de dosagem do fator de transcrição Nrf2 é um método sensível não radioativo que detecta a atividade de ligação do fator de transcrição específico em extratos nucleares. Uma placa com de 96 poços com um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi utilizado e uma dupla fita de DNA específico (*dsDNA*) contendo o elemento de resposta Nrf2 foi imobilizado nas cavidades da placa de 96 poços. O Nrf2 contido no extrato nuclear, liga-se especificamente e é detectado por adição de um anticorpo primário específico dirigido contra Nrf2. Um anticorpo secundário conjugado com HRP é adicionada para fornecer uma leitura colorimétrica a 450 nm.

4.11 Dosagem de IL-1 β

A determinação dos níveis séricos de IL-1 β em amostras do extrato citosólico do homogenato articular, foi realizada através do emprego de kit comercial (PrepoTech, Rock Hill, U.S.A), seguindo as instruções do fabricante. O ensaio baseia-se no método de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo sanduíche. A placa foi preparada com o anticorpo de captura e incubada *overnight*. No outro dia as amostras foram adicionadas, bem como o anticorpo de detecção e a avidina-HRP. Utilizou-se ABTS como substrato. O desenvolvimento da cor foi monitorada em um leitor de placas do tipo TECAN Infinity M200 com comprimento de onda 405 nm e correção de 650 nm a cada cinco minutos durante 60 minutos. Os resultados foram interpretados através da

interpolação de uma curva padrão através de ensaio colorimétrico. Todos os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

4.12 Dosagem de glutatona

A determinação de glutatona foi baseada na mensuração do conteúdo de tióis não-protêicos (NPSH), através do método descrito por ELLMAN (1959), com modificações. Primeiramente as articulações dos animais foram homogeneizadas com tampão de lise (TrisHCl 0,1 M e $MgCl_2$ 5 mM, pH 8,0) e centrifugado a 4°C por 3 minutos a 5000 x g. Em seguida separou-se uma alíquota do sobrenadante para dosagem da enzima Glutamato Cisteína Ligase e determinação de proteínas e com o restante do homogenato realizou-se a precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado. Seguiu-se de centrifugação a 5000 x g 4°C durante 5 min. O sobrenadante foi incubado com 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) em tampão fosfato (TFK) 1 M pH7,0. As absorbâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva padrão de glutatona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de NPSH. Os dados foram expressos como nmol de NPSH/mg de proteína.

4.13 Dosagem de glutamato cisteína ligase

A dosagem da enzima glutamato cisteína ligase foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por SEELIG E MEISTER (1985), com modificações. Primeiramente 100 µl de amostra (preparada como descrito no protocolo da dosagem de NPSH) foi adicionada a um tampão de ensaio (TrisHCl 0,1 M, KCl 0,15 mM, $MgCl_2$ 20 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0) contendo 0,1 mM de fosfoenolpiruvato, 0,5 mM de L-glutamato, 0,5 mM de L- α - aminobutirato, 0,25 mM de Na_2 -ATP. Em

seguida, foi adicionado 1 µl de uma mistura das enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) e 25 µl de NADH 2mM. Procedeu-se à leitura em aparelho Multileitora Spectramax Paradigm (Molecular Devices, EUA) em 340 nm, onde foi monitorado a oxidação do NADH a cada 30 segundos por 10 minutos a 37 °C.

4.14 Dosagem de peróxido de hidrogênio

A determinação de peróxido de hidrogênio baseou-se no protocolo descrito anteriormente por PICK e KEISARI (1980) com modificações. Resumidamente foram adicionados a 25 µl do homogenato do tecido articular, 15 µl de HPRO (peroxidase de raiz forte), 100 µl de fenolftaleína. Incubou-se durante 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. Parou-se a reação com 10 µl de NaOH 1 M. Realizou-se a leitura da placa em espectrofotômetro a 610 nm. Os resultados são expressos em µmol/g proteína.

4.15 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas, conforme o caso, por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keus ou Dunnet, ou ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Diferenças entre os grupos com valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

Os dados coletados foram submetidos a verificação de resultados que apresentaram grande afastamento dos demais valores da série, ou seja, valores *outliers*. A verificação dos *outliers* foi realizada através do

teste estatístico de Grubbs e os resultados que se enquadraram em ± 3 E.P.M foram definidos como *outliers* e retirados da análise estatística.

Os valores que não apresentaram distribuição normal foram transformados para escala logarítmica.

Utilizou-se para a realização das análises estatística o software Graph Pad Prism® (2005, San Diego, CA) versão 5.01.

4. RESULTADOS

5.1 Tratamento

De acordo com a tabela 2, pode-se observar que antes da administração do MSU, o tratamento com o CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias), 6 horas após a terceira e última administração) ou indometacina (10 mg/Kg, 1 hora após a administração) não alteraram os limiares nociceptivos mecânicos, os escores de nocicepção espontânea ou o diâmetro articular. Assim, os valores basais para estes parâmetros não foram diferentes entre os grupos antes da indução do ataque agudo de gota.

Tabela 2: Efeito do CDDO-Me sobre parâmetros nociceptivos e edema articular em camundongos.

Tratamento (v.o)	Hiperalgesia Mecânica (g)	Antes do Tratamento		Após o Tratamento		
		Nocicepção espontânea (Score)	Δ diâmetro da articulação (mm)	Hiperalgesia a Mecânica (g)	Nocicepção espontânea (Score)	Δ diâmetro da articulação (mm)
Veículo (10 mg/Kg)	2,12(±)0,31	0	0	2,62(±)0,24	0	0,04(±)0,03
CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias)	2,07(±)0,33	0	0	2,08(±)0,45	0	0,01(±)0,01
Indometacina (10mg/Kg)	1,54(±)0,17	0	0	2,68(±)0,19	0	0,02(±)0,01

Os dados apresentam as médias \pm E.P.M. Hiperalgesia mecânica foi expressa como limiar de retirada de pata (g). n= 8 para os grupos veículo e CDDO-Me e n= 9 para o grupo indometacina. ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Newman-Keuls.

Na tabela 3 pode-se observar os dados referentes ao consumo de água, consumo de ração e ganho de peso corporal dos animais Dos diferentes grupos antes da administração do MSU. De acordo com o exposto não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os diferentes grupos. O tratamento não apresentou diferença nos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo controle não tratado.

Tabela 3: Efeito do tratamento com veículo, CDDO-Me e indometacina sobre o consumo de água, ração e peso corporal em camundongos.

Tratamento (v.o)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (%)	Ganho de peso em (g)
Controle não tratados	8,28(±)3,28	6,23(±)0,95	1,95(±)0,56
Veículo (10 mg/Kg)	8,85(±)2,68	9,6(±)1,22	2,58(±)0,42
CDDO-Me (1mg/Kg por 3 dias)	6,68(±)2,68	6,58(±)0,44	1,99(±)0,47
Indometacina (10mg/Kg)	7,17(±)4,17	9,78(±)0,69	1,75(±)0,15

Os dados apresentam as médias \pm E.P.M. O consumo de água e ração é dado por grupo bem como o ganho de peso corporal. n= 6 para todos os grupos. ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Newman-Keuls.

5.2 Efeito do tratamento com CDDO-Me na hiperalgesia mecânica e nocicepção espontânea após protocolo experimental de artrite gotosa.

Três horas após a administração intra-articular do MSU, observou-se uma acentuada redução do limiar de retirada da pata (hiperalgesia mecânica), assim como um aumento nos escores de nocicepção espontânea dos animais tratados com MSU mais o veículo em comparação com os valores basais (Figura 3). Para determinar a dose utilizada no estudo do efeito do CDDO-Me na hiperalgesia e na inflamação no modelo agudo de gota realizou-se uma curva dose-resposta. Nas doses de 0,3 e 1 mg/Kg para o CDDO-Me e na dose de 10 mg/Kg a indometacina foram capazes de prevenir a hiperalgesia mecânica quando comparados com o grupo veículo 3 h após o tratamento. A maior dose testada de CDDO-Me (3 mg/Kg) não foi capaz de prevenir a hiperalgesia. Analisando os dados do painel B pode-se observar que apenas a dose de 1 mg/Kg/3 dias de CDDO-Me e a indometacina foram capazes de impedir o desenvolvimento de nocicepção espontânea quando comparados com o grupo veículo. As doses de 0,3 e 3 mg/kg do CDDO-Me não foram capazes de reduzir a nocicepção espontânea quando comparado com o grupo veículo.

Sendo assim, a dose de 1 mg/Kg/3 dias de CDDO-Me, que foi capaz de prevenir a hiperalgesia nos testes de nocicepção mecânica e espontânea, foi a dose escolhida para a realização dos demais experimentos.

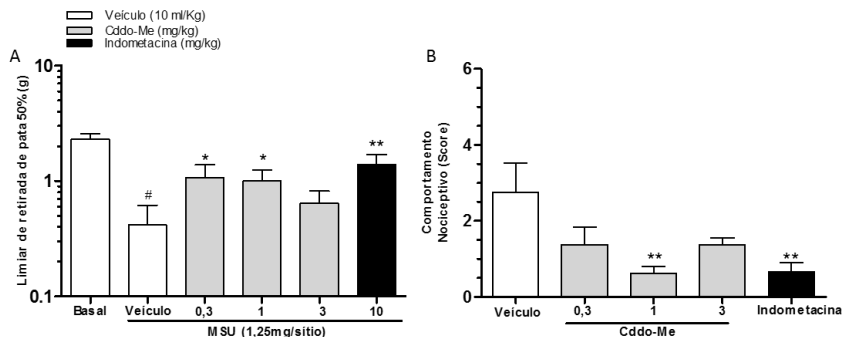


Figura 3: Curva de dose-resposta do CDDO-Me sobre os limiares nociceptivos de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota. Hiperalgesia mecânica (A) e nocicepção espontânea - score (B) 3 horas após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (PBS 10 mL/Kg), indometacina (10 mg/Kg) ou CDDO-ME (0,3; 1 e 3 mg/Kg,) v.o. após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (Veículo 10 mL/Kg), indometacina (10 mg/Kg) ou CDDO-ME (1 mg/Kg por 3 dias) v.o. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. de 8 camundongos do tipo Swiss por grupo. Não foram encontrados resultados outliers. Onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo controle e # $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao basal (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Dunnett). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

Na Figura 4A-B pode-se observar os dados referentes ao decurso temporal dos efeitos da dose de 1 mg/Kg/3 dias de CDDO-Me. No tempo de 3 horas após a indução da gota, os animais apresentaram hiperalgesia mecânica, que foi prevenida pelo tratamento com CDDO-Me ou indometacina se comparado ao tratamento dos animais do grupo veículo. Nos demais tempos observados, os animais do grupo veículo não apresentavam mais uma redução estatisticamente significativa dos limiares mecânicos (hiperalgesia mecânica) desencadeada pelo MSU.

Na Figura 4B é possível observar que o comportamento nociceptivo espontâneo é prevenido em 3 e 6 horas pelo pré-tratamento com CDDO-

Me e indometacina, quando comparado ao grupo veículo. Por ser o melhor para detecção dos parâmetros nociceptivos, o tempo de três horas após a administração do MSU foi utilizado para as outras medidas do processo inflamatório.

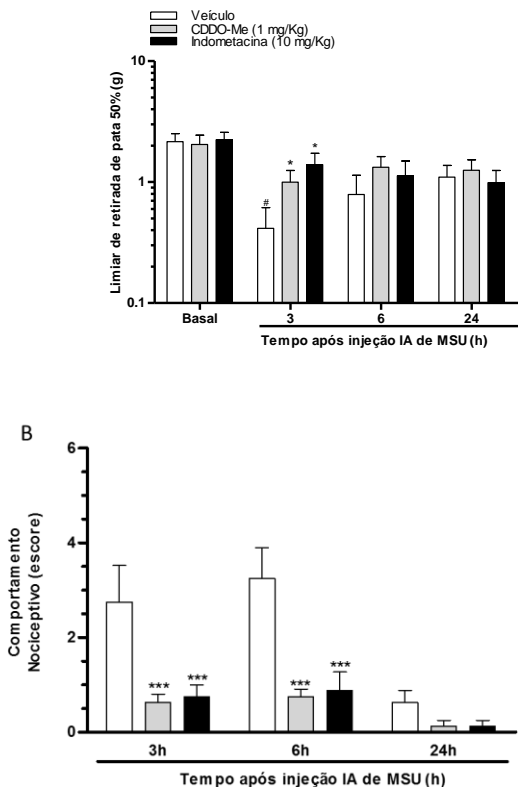


Figura 4: Duração da redução dos limiares nociceptivos em camundongos, após à indução de um ataque agudo de gota. Hiperalgesia mecânica (A) e nocicepção espontânea - Escore (B) após a administração intra-articular de 1,25mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (Veículo 10 mL/Kg), indometacina (10 mg/Kg) ou CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias,) v.o. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. de 8 camundongos do tipo Swiss por grupo, foi retirado 1 animal outlier por grupo (veículo e indometacina respectivamente). O eixo Y está representado de modo a mostrar o somatório máximo do comportamento nociceptivo que cada animal poderia alcançar. Onde * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ indicam diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo controle e [#] $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao basal (ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* Bonferroni). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.3 Nível sérico de ácido úrico

Conforme os dados apresentados na Figura 5, os animais do grupo veículo desenvolveram um aumento significativo de AU sérico quando comparados com os animais pertencentes ao grupo controle não tratado. O tratamento prévio com CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias), não preveniu o aumento de AU e os animais apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo veículo. O tratamento prévio com a indometacina no tempo de 3 horas após a indução da gota também não foi capaz de reduzir os níveis de AU no soro.

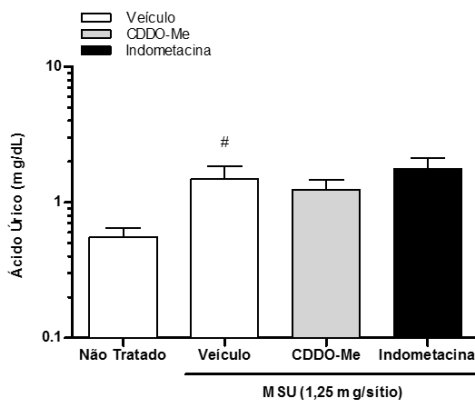


Figura 5: Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina sobre o nível sérico de ácido úrico em camundongos submetidos a um modelo de ataque agudo de gota. Nível sérico de ácido úrico em animais n (n= 9) após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (PBS 10 mL/Kg, n= 7) indometacina (10 mg/Kg, n= 7), CDDO-ME (1 mg/Kg/3 dias, n=9,) v.o. Foi retirado 1 animal outlier do grupo não tratado. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. Onde [#] $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo não tratado (ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* Dunnet). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.4 Diâmetro articular, número de leucócitos, nível de MPO e de proteínas no fluído sinovial

Os dados representados nas figuras 6A-D correspondem à determinação do diâmetro articular, número de leucócitos no lavado sinovial e determinação de MPO e proteínas no sobrenadante do lavado articular. De acordo com a figura 6A, o tratamento com o CDDO-Me ou indometacina foi capaz de prevenir o aumento do diâmetro da articulação (edema) causado pela administração de MSU, quando comparado com o grupo veículo. Houve um aumento significativo do número de leucócitos, da atividade da MPO e da concentração de proteínas no fluído sinovial quando comparou-se os animais do grupo veículo+MSU com os animais do grupo não- tratado.

O número de leucócitos no lavado da articulação foi significativamente diminuído nos animais tratados com o CDDO-Me quando comparados com os animais do grupos veículo ou indometacina. Na figura 6C e 6D, o tratamento com CDDO-Me e indometacina não foi capaz de reduzir a atividade da MPO ou a concentração de proteínas no sobrenadante do lavado articular quando comparados com os animais do grupo veículo.

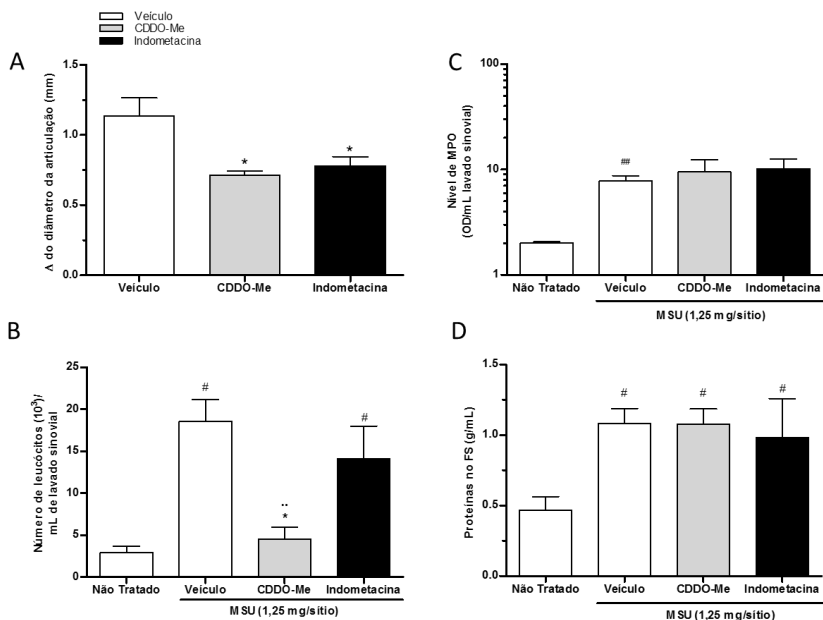


Figura 6. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina no edema articular, no número de leucócitos, na atividade de mieloperoxidase e na quantidade de proteínas no lavado articular de camundongos submetidos a um modelo de ataque agudo de gota. Diâmetro articular (A), número de leucócitos (B), nível MPO (C) e de proteínas no fluido sinovial (D) de camundongos não tratado e 3 horas após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (Veículo 10 mL/Kg) indometacina (10 mg/Kg), CDDO-ME (1 mg/Kg/3 dias) v.o. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. Diâmetro da articulação (n= 5 veículo e indometacina e n=4 CDDO-Me), número de leucócitos (n=6 não tratado, n=7 veículo, n=5 CDDO-Me e n=8 indometacina), MPO (n=4 não tratado, CDDO-Me e indometacina e n=3 veículo) e proteína (n=5 não tratado, CDDO-Me e indometacina e n=4 veículo). Foi retirado 1 animal outlier do grupo veículo na mensuração do edema articular; 1, 2 e 1 animais outliers respectivamente dos grupos não tratado, veículo e CDDO-Me na mensuração de MPO. Onde * $p<0,05$, indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo controle, ** $p<0,01$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo indometacina, # $p<0,05$ e ### $p<0,01$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo não tratado (ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* Dunnet para diâmetro articular e MPO e Newman-Kewls para número de leucócitos e nível de proteínas). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.5 Dosagem de SAA e IL-6 como marcadores inflamatórios séricos

Os dados apresentados na figura 7A-B mostram os marcadores séricos dosados no modelo de ataque de gota agudo em camundongos. Os animais do grupo veículo, que receberam a administração de MSU, não apresentaram diferença significativa das concentrações séricas de SAA ou IL-6 quando comparados com os animais do grupo não-tratado. Curiosamente, as concentrações de SAA ou IL-6 foram aumentadas significativamente para o grupo tratado com CDDO-Me, mas não com indometacina, quando comparado com os animais do grupo tratado com veículo ou com os animais não tratados.

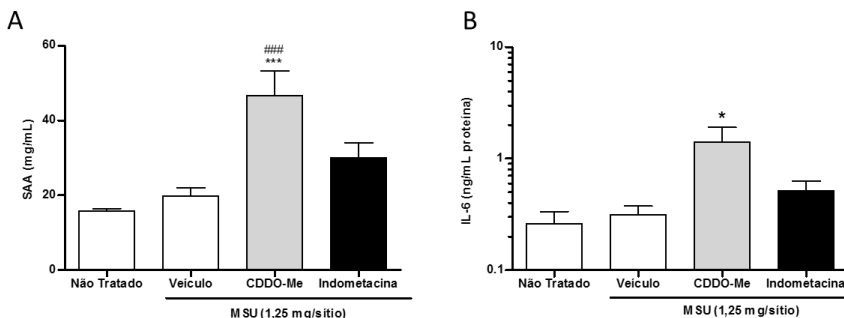


Figura 7. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina sobre os níveis séricos da interleucina IL-6 e da proteína SAA em camundongos submetidos a um modelo de ataque agudo de gota. SAA (A) e IL-6 (B) de camundongos não tratado e 3 horas após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (PBS 10 mL/Kg) indometacina (10 mg/Kg), CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias) v.o. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. SAA n=5 não tratado, n=8 veículo, n= CDDO-Me e n=7 indometacina. IL-6 n= 5 não tratado, n= 6 para demais grupos. Não foram encontrados outliers. Onde $^*p<0,05$ e $^{***}p<0,001$, indicam diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo controle e $^{###}p<0,01$ indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo não tratado (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* Dunnett). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.6 Níveis de IL-1 β no fluido sinovial

Os dados apresentados na Figura 8, correspondem à determinação dos níveis da citocina IL-1 β na fração citosólica do tecido articular. Os animais do grupo que receberam veículo e MSU não apresentaram diferença significativa na concentração de IL-1 β quando comparados com os animais do grupo não-tratado. O tratamento com o CDDO-Me não foi capaz de alterar a concentração da citocina IL-1 β quando comparado com o grupo veículo. Porém, o tratamento com indometacina aumentou significativamente a concentração da IL-1 β quando comparou-se com os grupos veículo ou não tratado.

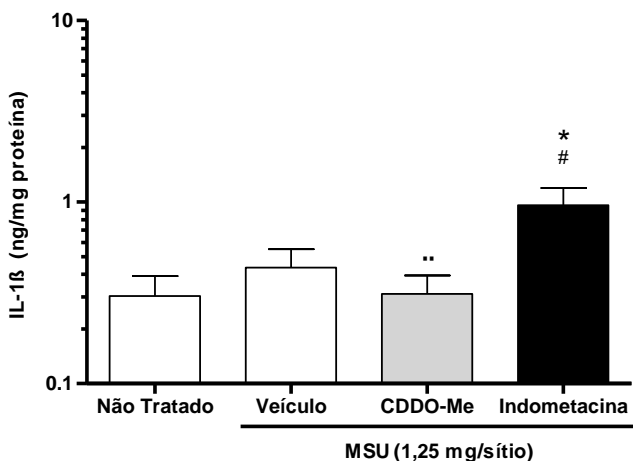


Figura 8. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-Me ou indometacina no nível da interleucina IL-1 β no extrato citosólico do sobrenadante do lavado articular de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota. Nível de IL-1 β no sobrenadante do lavado articular em camundongos não tratados (n= 5) e 3 horas após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (Veículo 10 mL/Kg, n= 4) indometacina (10 mg/Kg, n= 5), CDDO-Me (1 mg/Kg/ 3 dias, n=5,) v.o. Foi retirado 1 animal outlier do grupo veículo. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. Onde *p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo controle, **p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo indometacina e # p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo não tratado (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* NewmaN-Keuls). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.7 Níveis de estresse oxidativo no tecido articular

Nas figuras 9A e 9B estão representados os dados referentes às concentrações de H₂O₂ e de glutatona (na forma de tióis não-proteicos-NPSH) e a atividade de Glutamato cisteína ligase no homogenato do tecido articular, respectivamente os animais do grupo que recebeu veículo e MSU apresentaram um aumento da concentração de H₂O₂ e uma

redução da atividade da Glutamato cisteína ligase no homogenato do tecido articular. Tanto o tratamento com CDDO-Me quanto com indometacina foram capazes de prevenir o aumento da concentração de H_2O_2 , mas não a redução da atividade da Glutamato cisteína ligase comparados com os animais do grupo veículo. lo. Na figura 9B é possível verificar que não houve diferença nos níveis de glutathione (NPSH) entre os diferentes grupos.

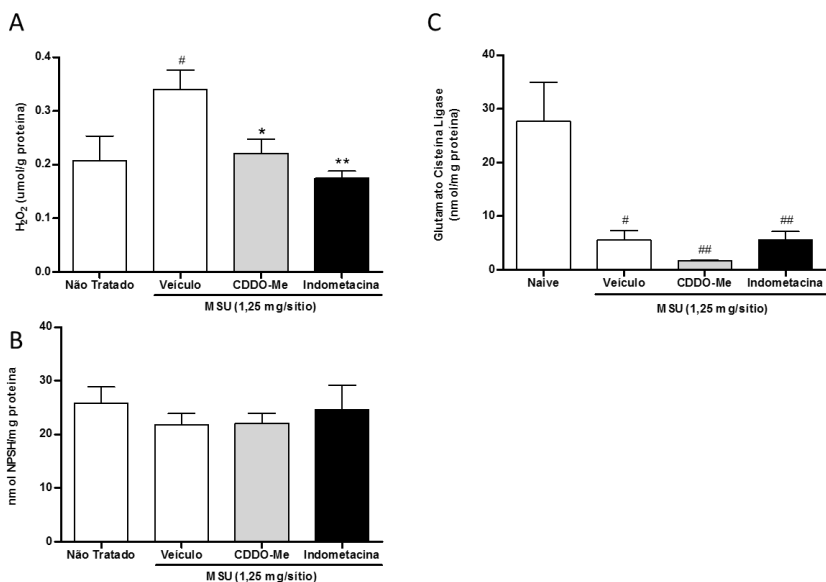


Figura 9. Efeito do tratamento prévio com veículo, CDDO-ME ou indometacina sobre os parâmetros de estresse oxidativo no tecido articular de camundongos submetidos à um modelo de ataque agudo de gota. H₂O₂ (A), níveis de tióis não proteicos (NPSH) (B) e atividade da enzima Glutamato Cisteína Ligase (C) no tecido articular de camundongos não tratados e 3 horas após a administração intra-articular de 1,25 mg MSU/sítio em camundongos pré-tratados com veículo (PBS 10 mL/Kg) indometacina (10 mg/Kg), CDDO-Me (1 mg/Kg/3 dias) v.o. Não foram encontrados outliers. Resultados expressos pela média \pm E.P.M. n= 6 para H₂O₂, n= 4 para NPSH e Glutamato Cisteína Ligase. Onde ^{*}p<0,05 e ^{**}p<0,01, indicam diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo controle e ^{##}p<0,01 indica diferença estatística significativa quando comparado com o valor correspondente ao grupo não tratado (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* Dunnett). Para detecção de outliers foi utilizado o teste de Grubbs.

5.8 Nível de Nrf2 no extrato nuclear da articulação

Não foi possível determinar os níveis de Nrf2 no tecido articular de camundongos submetidos ao protocolo experimental de ataque agudo de gota, pois as concentrações do fator Nrf2 foram não detectáveis em nossas amostras, provavelmente devido à pouca sensibilidade do kit utilizado.

6. DISCUSSÃO

A gota é uma das doenças descritas mais antigas no mundo. Relatos do Egito (2640 a.C) e de Hipócrates (século V a.C) confirmam a existência dessa enfermidade assolando os homens há muitos de séculos. A gota era conhecida como doença dos reis, uma vez que estava associada ao consumo de carnes e vinhos, ou seja, apenas pessoas afortunadas poderiam levar esse tipo de vida. Com o advento da vida moderna, a facilitação do acesso e o aumento do consumo de bebidas alcóolicas e o consumo de alimentos de origem animal, a gota vem aumentando consideravelmente no mundo. A prevalência de gota aumentou recentemente, com ~ 6,1 milhões de pessoas com apenas uma história de gota nos EUA (NUKI, SIMKIN; 2006; LAWRENCE, et al.; 2008). Caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de ácido úrico no soro, seguido da sua deposição na forma de cristais nas articulações, a gota leva a uma inflamação articular intensa e limitada que, se não tratada, pode resultar na formação da gota tofácea. Mesmo com toda a modernização da terapia medicamentosa, ainda não há um único esquema terapêutico que seja eficaz no tratamento desta doença como um todo. Talvez o avanço histórico mais importante no tratamento da hiperuricemia foi o desenvolvimento de inibidores da xantina oxidase, que são eficazes na redução dos níveis de urato no plasma. Inicialmente o tratamento consiste na utilização de medicamentos que levam à diminuição dos níveis de AU séricos, bem como na administração de anti-inflamatórios para aliviar os sintomas durante um ataque agudo. Em casos de pacientes refratários ao tratamento convencional, antagonistas ou inibidores da IL-1 β também podem ser utilizados. Porém, além do alto custo destes tratamentos e a falta de eficácia em todos os pacientes novas alternativas ainda se tornam

necessárias para o tratamento da patologia (NUKI, SIMKIN; 2006; KHANNA, et al., 2012 a,b; SO, et al; 2007).

A utilização de plantas e seus derivados sintéticos pelo homem na busca de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos vem sendo estudado há vários séculos. Com base nisso, procedeu-se a busca na literatura para encontrar uma substância com ação anti-inflamatória já comprovada em modelos animais e capaz de ser utilizada no tratamento de um ataque agudo e/ou atuar como coadjuvante a outras drogas. O CDDO-Me, um triterpeno sintético derivado da alteração estrutural do ácido oleanólico, é descrito como um potente anti-inflamatório que também possui ação antitumorogênica. A grande família CDDO é descrita também como potente indutor de enzimas de fase II e inibidores da inflamação. Estudos tem demonstrado que os CDDOs podem proteger contra a tumorigênese hepática agindo, em parte, por induzir a transcrição de genes antioxidantes citoprotetores através da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE (PHILLIPS, 2006; YATES, 2007).

Estudos em diferentes modelos experimentais tem apontado vários mecanismos nas ações biológicas do CDDO-Me, incluindo sua ação na inibição de algumas citocinas pró-inflamatórias e sobre outros marcadores inflamatórios. O tratamento prévio com CDDO-Me preveniu a inflamação do cólon em camundongos C57BL/6J tratados com uma dieta hipercalórica, no modelo de obesidade (DINH et al.; 2016). Sabe-se que a obesidade induz uma inflamação crônica e de baixo grau aumentando o risco de câncer de cólon. Neste estudo, Dinh et al. (2016) relataram os efeitos preventivos do CDDO-Me sobre a inflamação do cólon através da atuação sobre macrófagos, NF- κ B, citocinas, COX-2, Ki67, deposição de gordura e microflora intestinal. Em outro estudo

também utilizando uma dieta hipercalórica, o CDDO-Me foi capaz de impedir a resistência à insulina e o desenvolvimento de esteatose hepática em camundongos, através da modulação de moléculas envolvidas na sinalização da insulina, no metabolismo lipídico e na inflamação do fígado (CAMER, et al.; 2015). Em modelo de inflamação pulmonar, Chen et al, (2015), avaliaram a eficácia terapêutica do CDDO-Me na lesão pulmonar aguda induzida por LPS. O principal objetivo do estudo foi explorar o efeito protetor do triterpeno sintético na inflamação. Foram avaliados a atividade de MPO pulmonar, número de neutrófilos, citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , e TNF- α entre outros marcadores. O estudo mostrou evidências de que o tratamento prévio poderia ser um candidato terapêutico na lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Tendo em vista estes estudos utilizando modelos animais de inflamação e a ação do CDDO-Me na inflamação, bem como a ausência de dados publicados sobre a ação do CDDO-Me no modelo de ataque agudo de gota, realizamos o presente estudo. Neste estudo optou-se pelo tratamento prévio com CDDO-Me durante três dias, conforme descrito por YATES et al.; (2007). Pode-se observar através de dados comportamentais e bioquímicos que o triterpeno apresentou um efeito protetor relevante na nocicepção e na inflamação neste modelo de ataque agudo de gota.

Muitos estudos com substâncias promissoras são impedidos de avançarem para a clínica devido à toxicidade dessas substâncias. De nada adianta um tratamento ser efetivo para determinada patologia se o mesmo apresentar um nível intolerável de toxicidade. Antes da indução da gota, foram coletados dados referentes ao consumo de água, ração e ao aumento do peso corporal durante o tratamento, quando utilizada a dose de 1

mg/Kg de CDDO-Me por 3 dias, de 10 mg/Kg de indometacina ou do veículo. Apenas nossos resultados não indicaram possíveis danos agudos aos animais causados pelos tratamentos. Além disto, os tratamentos utilizados (CDDO-Me e indometacina) também não foram capazes de alterar *per se* os limiares nociceptivos mecânicos antes da indução do ataque agudo de gota. Esses dados demonstram que a utilização do CDDO-Me, pelo menos no esquema de tratamento utilizado aqui, não causa sinais de toxicidade aguda detectáveis por estes testes.

Com o intuito de utilizar o modelo experimental que mais se aproxima de um ataque agudo de gota em humanos, que inicialmente ocorre em uma articulação pequena e periférica, utilizou-se dados de experimentos pilotos (dados não publicados), para determinar qual modelo apresentava as validades necessárias para o nosso estudo. A administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal, na dose de 1,25 mg/sítio foi capaz de produzir a diminuição do limiar nociceptivo mecânico, bem como nocicepção espontânea quando comparado com outras doses de MSU e outra articulação (fêmur-tibial). Ainda, este modelo foi capaz de induzir um aumento do diâmetro da articulação (edema) que é um importante sintoma clínico observado durante ataques agudos de gota em humanos (DALBETH; LINDSAY, 2012).

A determinação da dose de CDDO-Me a ser utilizada partiu da realização de uma curva dose resposta. Foi possível observar que tanto a dose de 0,3 mg/Kg como a de 1 mg/Kg durante 3 dias foram capazes de impedir a hiperalgesia mecânica quando comparou-se os grupos com o grupo veículo. Por outro lado, a dose de 1 mg/Kg foi a única que conseguiu prevenir o comportamento nociceptivo espontâneo. O modelo da injeção de MSU na articulação tíbio-tarsal foi capaz de causar uma

diminuição do limiar nociceptivo até 3 h após a administração dos cristais de MSU. A sustentação do comportamento nociceptivo espontâneo ocorreu por mais tempo, ou seja, até 6 h após a indução da gota. Ambos os comportamentos foram prevenidos com a utilização de CDDO-Me e da indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal já utilizado na clínica durante ataques agudos da gota. Assim, o tratamento prévio com CDDO-Me parece ser útil no manejo doloroso de um ataque agudo de gota. Até onde conhecemos, este é o primeiro estudo a demonstrar efeito antinociceptivo para triterpenos sintéticos derivados do CDDO.

A hiperuricemia é definida como uma concentração de ácido úrico sérico que excede o limite de solubilidade, e é considerada uma anormalidade bioquímica. Níveis próximos ao limite de saturação são um alerta ao desenvolvimento da gota, porém nem todas as pessoas hiperuricemicas sofrerão um ataque agudo. Sabe-se que a hiperuricemia antecede o desenvolvimento da gota uma vez que o aumento sérico de AU leva à cristalização deste nas articulações e em tecidos periarticulares (BECKER, et al.; 2005). O aumento dos níveis séricos de ácido úrico detectado em nossos animais que tiveram a indução de um ataque agudo de gota, quando comparados com os animais sem tratamento, vem de encontro com os dados da literatura. Eventos traumáticos e cirúrgicos tendem a anteceder um ataque agudo de gota, o que pode ser explicado pelo rompimento da membrana celular, ocasionando a liberação do ácido úrico existente no citoplasma da célula, fazendo com que ocorra um aumento dos níveis de ácido úrico séricos (RICHETTE; BARDIN, 2010). Os dados bioquímicos referentes à dosagem de ácido úrico demonstraram que os tratamentos com CDDO-Me e indometacina não alteraram os níveis séricos de ácido úrico em comparação com os níveis séricos dos

animais tratados com veículo, sugerindo os efeitos produzidos pelo CDDO-Me neste modelo de gota não está relacionado com o controle da uricemia.

Os eventos iniciais após a indução da gota são caracterizados por vasodilação e aumento da permeabilidade capilar no tecido articular periférico à articulação afetada por um ataque agudo de gota. Há um alargamento do endotélio vascular formando pequenos poros, ou seja, há contração das células endoteliais permitindo o escape de proteínas plasmáticas necessárias à formação do exsudato inflamatório e edema (RANG, et al., 2007). De fato, verificamos um aumento no diâmetro articular (interpretado como edema) e no extravasamento plasmático (indiretamente medido pela concentração de proteínas no lavado articular) nos animais tratados com MSU e veículo, quando comparados com animais não-tratados. O edema pode ocorrer como resultado de alterações nas pressões (hidrostáticas e oncóticas) que atuam entre as paredes microvasculares, alterações nas estruturas moleculares que constituem a barreira para o fluxo de fluido e de soluto na parede endotelial, ou ainda alterações no sistema de escoamento linfático (SCALLAN, 2010). Curiosamente, o tratamento com CDDO-Me ou com indometacina foram capazes de reduzir o edema, mas não o extravasamento plasmático induzido pela injeção de MSU. Assim a redução do edema causada pelos tratamentos com CDDO-Me ou com indometacina parecem não depender da redução do extravasamento plasmático, mas sim por uma melhora do escoamento linfático produzido pelo tratamentos. Alternativamente, a concentração de proteínas totais no lavado sinovial pode não ser um bom parâmetro de extravasamento plasmático em nosso modelo. Mais experimentos devem ser realizados

(como por exemplo a medida mais direta de extravasamento plasmático, através da utilização azul de Evans) para confirmar nossos achados.

A deposição de MSU na articulação leva a uma resposta inflamatória com grande infiltração de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios por células residentes (incluindo sinoviócitos tipo macrófagos) e/ou células que migram para o foco inflamatório (DALBETH, et al.; 2005). O processo inflamatório faz com que ocorra um aumento da migração celular, levando à fagocitose. Este processo tem como objetivo eliminar os cristais de MSU. Não só extravasamento plasmático, mas também a migração celular levam à formação do aumento do diâmetro da articulação afetada pelo ataque agudo de gota (DALBETH; HASKARD, 2005). Verificamos que o tratamento com CDDO-Me, mas não com indometacina, previne o aumento no número de leucócitos induzido pelo MSU no lavado articular. Devido ao baixo volume de amostra impedir a realização de uma contagem diferencial de leucócitos, realizamos a medida da atividade da enzima mieloperoxidase para verificar se este tipo celular poderia ter sido o alvo para a ação do CDDO-Me. Neutrófilos são células importantes do sistema imune e desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro. Estas células estão equipadas com várias armas, em particular a mieloperoxidase, é a mais abundante enzima expressa nos grânulos de neutrófilos (KATO, 2016). Por isso neste trabalho foi utilizada como medida indireta da infiltração de neutrófilos no foco inflamatório. Apesar do tratamento com MSU e veículo aumentarem a atividade da MPO, comparado a animais não tratados, o tratamento com CDDO-Me não preveniu este evento. Nossos resultados demonstram que a redução do número de leucócitos causada pelo CDDO-Me parece não estar relacionada com um

decréscimo na infiltração de neutrófilos. Um outro tipo importante de leucócitos observados em fluido sinovial de pacientes com gota são os macrófagos residentes na articulação (sinoviócitos tipo A ou tipo macrófago) (MALAWISTA, 2011). Este tipo de sinoviócitos pode se deslocar da membrana sinovial, onde normalmente reside, para o líquido sinovial na presença de algum agente estranho (p.ex. cristais e bactérias). Assim o tratamento com CDDO-Me poderia prevenir os deslocamento de sinoviócitos tipo macrófagos para o líquido sinovial após a estimulação com MSU. Porém mais experimentos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Os cristais de urato monossódico estimulam os macrófagos e mastócitos a secretarem IL-1 β por meio da montagem da inflamassoma NALP3 e ativação da caspase-1. Sugere-se na literatura que a citocina pró-inflamatória IL-1 β tem um papel fundamental na gota (SO, et al; 2007; REBER et al., 2014). Nossos resultados indicam que 3 horas após o tratamento com MSU não foi possível detectar aumento na concentração de IL-1 β no extrato citosólico do tecido articular de animais tratados com MSU e com veículo ou CDDO-Me. Este resultado pode ser explicado pela preparação de nossas amostras, pois com uso de detergente no tampão de homogeneização é inviável diferenciar a citocina secretada (extracelular) da pré-formada (intracelular). Inesperadamente, o tratamento com indometacina foi capaz de aumentar a concentração de IL-1 β no tecido sinovial, um resultado sem suporte na literatura para explicação. Um outro problema em nosso ensaio foi o pequeno tamanho da amostra (n=5) em relação aos outros testes. Desta forma, este experimento deve ser repetido com outra forma de preparação da amostra para confirmar os presentes achados.

A citocina pró-inflamatória IL-6 e a proteína de fase aguda SAA encontram-se elevadas no sangue na maioria dos processos inflamatórios, incluindo a gota em pacientes (ROSEFF, 1987; CAVALCANTI, 2016; CRISAN, 2016). A IL-6, em conjunto com a IL-1 β produz várias quimiocinas que conduzem a migração de neutrófilos para o foco da inflamação. Além disso, dados da literatura apontam que o processamento proteolítico do seu receptor (IL-6R) leva a uma mudança no recrutamento de neutrófilos para monócitos (SCHELLER ET AL, 2011). Ou seja, a IL-6 é responsável pela amplificação do processo inflamatório (CHOE ET AL, 2011; GUERNE ET AL., 1989; ROSE-JOHN, 2012). Por ser também um objetivo investigar o efeito do CDDO-Me na infiltração de leucócitos induzida pelo MSU, a citocina IL-6 foi dosada. Porém, a associação entre os níveis séricos de citocinas e os sintomas da gota ainda não são bem compreendidos. um estudo feito por Cavalcanti e colaboradores, em 2016 avaliou o perfil sérico de várias citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22 e IL-23). Essas citocinas desencadeiam uma cascata de mediadores pró-inflamatórios que conduzem à ativação do endotélio e ao recrutamento de leucócitos. Nos seres humanos, a SAA é uma das principais proteínas de fase aguda, e sua concentração no soro aumenta até 1000 vezes durante uma resposta de fase aguda. Parte das suas capacidades pró-inflamatórias reside na sua capacidade de induzir citocinas e quimiocinas e exercer atividade quimiotática através de seus receptores, predominantemente TLR2 e FPR2, respectivamente. Os dados do nosso estudo mostraram que o MSU não foi capaz de aumentar os níveis séricos da IL-6 e da SAA, indicando que nosso modelo em camundongos não parece ter validade de constructo para sinais sistêmicos do ataque agudo de gota que ocorre em humanos. Além disto, houve um

aumento significativo nos níveis de IL-6 e SAA no grupo tratado com CDDO-Me quando comparado com os demais grupos. O aumento de SAA e IL-6 nos animais tratados com CDDO-Me pode ser explicado como uma tentativa do organismo em recrutar defesas para o combate da inflamação.

Durante um ataque agudo de gota, o organismo tenta se livrar dos cristais de MSU deixando o sistema imune em estado de atenção, pois o MSU atua como um DAMP. Primeiramente a resposta inflamatória aguda tenta se livrar do cristal através da fagocitose e outros eventos a fim de restaurar a homeostase sem causar danos ao organismo. O processo de combate a inflamação causada pelo MSU também desencadeia a formação de ROS, porém o mecanismo como isso ocorre ainda não foi elucidado. Estudos apontam que a superprodução de ROS durante um ataque agudo de gota contribui para a resposta dolorosa e inflamatória causada pelo MSU (ZAMUDIO-CUEVAS et al.; 2016). Trevisan et al.; (2014) demonstraram que a injeção de H_2O_2 por via intraplantar ou intra-articular é capaz de induzir nocicepção e edema, estes dados vem de encontro com os dados encontrados neste trabalho. Os animais previamente tratados com CDDO-Me e indometacina não apresentaram hiperalgesia e edema, bem como o nível de H_2O_2 menores quando comparados com os animais do grupo veículo. Ainda, TREVISAN e colaboradores, (2014) demonstraram que a utilização de um agente redutor (DTT) é capaz de reverter a ativação do receptor TRPA1 pelo H_2O_2 , protegendo os animais da indução das respostas nociceptivas e edematogênicas causadas pela administração de MSU. Este resultado vem de encontro com o papel benéfico do tratamento prévio com CDDO-Me durante o ataque agudo de gota, uma vez que este composto possui

seu mecanismo de ação pela via de sinalização Keap1-Nrf2 de acordo com a literatura.

O efeito benéfico do tratamento prévio com CDDO-Me pode ser atribuído à ativação do complexo Keap1-Nrf2-Are, pois ao ligar-se ao Keap-1 no citoplasma da célula o CDDO-Me libera o Nrf2 para que atue no núcleo da célula, levando a um aumento da transcrição de enzimas de fase II (LIBY et al, 2007). Infelizmente o kit utilizado para a detecção de Nrf2 não foi sensível o suficiente para que pudéssemos quantificar a sua translocação para o núcleo. Porém tendo em vista o conjunto de dados deste estudo, pode-se observar que o a ação do CDDO-Me foi benéfica durante um ataque agudo de gota.

Como descrito acima, o Nrf2 leva à transcrição de enzimas de fase II, entre elas a enzima glutamato cisteína ligase, uma enzima chave para a síntese de glutathione. A glutathione é um tiol tripeptídico sintetizado endogenamente que existe nos organismos nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Possui propriedades antioxidantes importantes e está presente em vários processos celulares básicos, como a síntese de proteínas, e de DNA e sinalização redox. No processo inflamatório, a glutathione atua como antioxidante sobre os ROS gerados na explosão respiratórias das células que realizam fagocitose, como os neutrófilos. A capacidade da glutathione ser sintetizada é controlada por vários fatores incluindo a atividade da enzima glutamato cisteína ligase, esta enzima limita a velocidade na síntese de glutathione e realiza o primeiro passo dependente de ATP para a síntese de glutathione (MEISTER, 1983; FRANKLIN, et al.; 2009). A dosagem de glutathione pelo método de tióis não-proteicos, um método indireto para a determinação de GSH, demonstrou que não houve alterações nos níveis de GSH durante o ataque

agudo e que os tratamentos não interferiram nos níveis teciduais desta enzima. De certa maneira os dados indicam que no modelo de ataque agudo utilizado não houve consumo de glutatona, uma vez que todos os grupos apresentaram níveis similares. Porém a dosagem da enzima glutamato cisteína ligase (GCL) demonstrou que houve uma redução significativa na atividade da GCL nos grupos que tiveram o ataque de gota induzido. Os resultados referentes à diminuição na atividade da GCL e a manutenção nos níveis de NPSH pode ser atribuído ao fato de que ambas as dosagens foram realizadas ao mesmo tempo após a indução do ataque agudo de gota.

A tabela 4 representa resumidamente os resultados obtidos. Em síntese, nossos dados demonstram pela primeira vez que o tratamento prévio com CDDO-Me foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica e a nocicepção espontânea em modelo de ataque agudo de gota em camundongos. O tratamento prévio também foi capaz de prevenir o aumento do número de leucócitos no local da inflamação, o que pode ter contribuído para a diminuição dos níveis de H_2O_2 causados pela explosão respiratória dos macrófagos durante o processo de fagocitose e consequentemente diminuindo o estresse oxidativo ocasionado pelos cristais de MSU.

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos após o tratamento prévio com CDDO-Me ou Indometacina em camundongos submetidos a um modelo de ataque agudo de gota.

	CDDO-ME (1 mg/Kg/3 dias)	INDOMETACINA (10 mg/kg)
Hiperalgisia Mecânica	↓	↓
Comportamento Nociceptivo Espontâneo	↓	↓
Nível Sérico de Ácido Úrico	↔	↔
Edema Articular	↓	↓
MPO	↔	↔
Número de Leucócitos	↓	↔
Dosagem de Proteínas	↔	↔
SAA	↑	↔
IL-6	↑	↔
IL-1β	↔	↑
H2O2	↓	↓
NPSH	↔	↔
GCL	↔	↔

↓ reduziu o efeito/concentração em relação ao animal tratado com veículo;
↔ não alterou o efeito/concentração em relação ao animal tratado com veículo;
↑ aumentou o efeito/concentração em relação ao animal não tratado

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos com este estudo é possível concluir que em um modelo experimental de ataque agudo de gota em camundongos:

- a) o CDDO-Me foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica e a nocicepção espontânea;
- a) após a administração do cristal na articulação tíbio-tarsal, o CDDO-Me foi eficaz no combate à migração leucocitária para o foco inflamatório;
- b) quando comparado com a indometacina, o CDDO-Me mostrou-se vantajoso uma vez que houve uma diminuição do infiltrado leucocitário e dos níveis de peróxido de hidrogênio.
- c) O CDDO-Me induziu uma elevação dos marcadores inflamatórios séricos IL-6 e SAA.

Analisados em conjunto os presentes resultados demonstram que o tratamento com CDDO-Me pode prevenir parcialmente o desenvolvimento do ataque agudo de gota em camundongos, porém sugerem que o CDDO-Me não parece ser superior à indometacina em produzir este efeito.

8. REFERÊNCIAS

ABED, D et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B*, v. 5, n. 4, Jul, p. 285-99, 2015.

AULETTA, J et al. The synthetic triterpenoid, CDDO-Me, modulates the proinflammatory response to in vivo lipopolysaccharide challenge. *J Interferon Cytokine Res*, v.30, n.7, Jul, p.497-508, 2009.

BECKER, M et al. Febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase: a twenty-eight-day, multicenter, phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response clinical trial examining safety and efficacy in patients with gout. *Arthritis Rheum*, v. 52, n. 3, Mar, p. 916-23, 2005.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, May, p. 248-54, 1976.

CAMER, D et al. Bardoxolone methyl prevents insulin resistance and the development of hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *Mol Cell Endocrinol*, v. 5, n. 412, Set, p. 36-43, 2015.

CAO, Y et al. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, v. 392, n. 6674, Mar, p. 390-4.

CAVALCANTI, N et al. Cytokine Profile in Gout: Inflammation Driven by IL-6 and IL-18? *Immunol Invest*, v. 45, n. 5, Jul, p. 383-95, 2016.

CHAPLAN, S. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, v. 53, n.1, Jul, p. 55-63, 1994.

CHEN, T. et al. The protective effect of CDDO-Me on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 25, n. 1 Mar, p. 55-64, 2015.

CHOE, J. et al. Radiographic bone damage in chronic gout is negatively associated with the inflammatory cytokines soluble interleukin 6

receptor and osteoprotegerin. *J Rheumatol*, v. 38, n. 3, Mar, p. 385-91, 2011.

CODERRE, T, WAL, P. Ankle Joint Urate Arthritis in Rats Provides a Useful Tool for the Evaluation of Analgesic and Anti-Arthritic Agents. *Pharmacol Biochem Behav*, v.29, n. 23, Mar, p.461-466, 1988.

CRISAN, T et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis*, v. 75, n. 4, Abr, 755-62, 2016.

CRONSTEIN, B, SUNKUREDDI, P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. *J Clin Rheumatol*. v. 19, n. 1, Jan, p. 19-29. 2013.

DALBETH N; HASKARD D. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology (Oxford)*. v. 44, n. 9, Set, p. 1090-6,2005.

DALBETH, N; LINDSAY, K. The patient's experience of gout: new insights to optimize management. *Curr Rheumatol Rep*, v. 14, n. 2, Abr, p. 173-8, 2012.

DALBETH, N, STAMP, L. Hyperuricaemia and gout: Time for a new staging system? *Ann Rheum Dis*, v. 73, n.9, Set, p.1598–1600, 2014.

DALBETH, N et al. Outcome measures in acute gout: A systematic literature review. *J Rheumatol*, v. 41, n. 3, Mar, p. 558–568, 2014.

DE BONT, R, VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, v. 19, n. 3, Maio, p. 169-85, 2004.

DE BUCK, M et al. The cytokine-serum amyloid A-chemokine network. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 55, n. 69, Agos, p.15-30, 2015.

DINH, C et al. Bardoxolone Methyl Prevents Mesenteric Fat Deposition and Inflammation in High-Fat Diet Mice. *Scientific World Journal*, Nov, 2015.

DINKOVA-KOSTOVA, A. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*, v. 52, Jun, p. 128-38, 2008.

DIXON WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 20, p. 441-62, 1980.

ELLMAN, G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, v. 82, n. 1, May, p. 70-7, 1959.

FRANKLIN, C et al. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* v. 30, n. 1-2, Fev-Abr, p. 86-98, 2009.

GUERNE, P et al. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum.* v. 32, n. 11, Nov, p. 1443-52, 1989.

HOFFMEISTER, C, et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. *Rheumatology (Oxford)*, v. 53, n. 2, Feb, p. 240–249, 2014.

HONG, D et al. A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res*, v. 18, n. 12, Mai, p. 3396–3406, 2012.

KATO, Y. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J Clin Biochem Nutr*, v.58, n. 2, Mar, p.99-104, 2016.

KHANNA, D, et al. American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: Systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, v. 64, n. 10, Oct, p. 1431–46, 2012a.

KHANNA, D, et al. American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: Therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis. *Arthritis Care Rese (Hoboken)*, v.64, n. 10. Oct, p. 1447–61, 2012b.

KUO, C., et al. Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol*, v. 11, n. 11, Nov, p. 649–62, 2015

LAWRENCE R. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States, Part II. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 5, Jan, p.26-35, 2008.

LI, H, HORKE, S, FORSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*, v. 34, n. 6, Jun, p. 313-9, 2013.

LIBY, K; YORE M, SPORN M. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of câncer. *Nat. Rev. Cancer*, v.7, n. 5, Maio, p. 357-369, 2007.

LYAKHOVICH, V. et al. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element. *Biochemistry (Mosc)*, v. 71, n. 9, Set, p. 962-74, 2006.

MACFARLANE, L, KIM, S. Gout: A review of nonmodifiable and modifiable risk factors. *Rheum Dis Clin North Am*, v.40, n. 4, Nov, p. 581–604, 2014.

MALAWISTA, S, DE BOISFLEURY, A, NACCACHE, P. Inflammatory gout: Observations over a halfcentury. *FASEB J*, v. 25, n. 12, Dez, p. 4073–78. 2011.

MARTINON, F, MAYOR, A, TSCHOPP, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu Rev of Immunol*, v. 27, p.229–265, 2009.

McGRATH, J et al. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*, v.160, n.7, Aug, p.1573–6, 2010.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, v. 220, n. 4596, Abr, p. 472-7, 1983.

NEOGI, T. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med*, v. 364, n. 5, Fev, p. 443–52, 2011.

NEOGI, T et al. 2015 gout classification criteria: An American College of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*, v. 74, n. 10, Oct, p. 1789-98, 2015.

NUKI, G, SIMKIN, P. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Res Ther*, v. 8, Abr, Suppl 1:S1, 2006.

PASCUAL, E et al. Mechanisms of crystal formation in gout—a structural approach. *Nat. Rev. Rheumatol*, v.11, n. 12, Dec., p. 725–730, 2015.

PHILLIPS, D et al. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol*, v. 9, n. 3, Jun, p. 305-14, 2006.

PHILLIPS, R et al. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization Dereth. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, n. 3, Junho, p. 305–314, 2006.

PICK, E; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980.

RANG, H, et al. *Farmacologia*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REES, F, HUI, M, DOHERTY, M. Optimizing current treatment of gout. *Nat Rev Rheumatol*, v. 10, n. 5, Maio, p. 271-83, 2014.

REGINATO, A. The genetics of hyperuricaemia and gout. *Nat Rev Rheumatol*, v. 8, n. 10, Set, p. 610–621, 2012.

RICHETTE, P, BARDIN, T. Gout. *Lancet*, v. 375, n. 9711, Ago, p. 318–328, 2010.

ROSEFF, R et al. The acute phase response in gout. *J. Rheumatol*. v. 14, n. 5, Out, p. 974-7, 1987.

ROCK, K, KATAOKA, H, LAI, J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol*, v. 9, n. 1, Jan, p. 13–23, 2013.

RODDY, E, DOHERTY, M. Gout. *Epidemiology of gout. Arthritis Res Ther*, v. 12, n. 6, Dez, p. 223, 2010.

ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*, v. 8, n. 9 Out, p. 1237-47, 2012.

SACALLAN, J et al. Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53445/>. Acesso em: 17 de out.2016.

SCHELLER, J. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1813, n. 5, Maio, p. 878–88, 2011.

SEDELNIKOVA O ET AL. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*, v. 704, n. 1-3, Abr-Jun, p. 152–159, 2010.

SEELIG G, MEISTER A. Glutathione biosynthesis; gammaglutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol*, v. 113, p.379–390, 1985.

SILVA, C. Papel do Receptor B1 para cininas e o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina em ataques agudos de gota em roedores. 119 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2014.

SILVA, C. The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann Rheum Dis*, v. 75, n. 1, Jan, 260-68, 2016.

SMITH, H, BRACKEN, D, SMITH, J. Gout: Current insights and future perspectives. *J of Pain*, v. 12, n. 11, Nov, 2011.

SO, A. et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*, v. 9, n. 2, p. R28, 2007.

SUZUKI K et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*, v. 132, n. 2, Jul, p. 345-52, 1983.

TERKELTAUB, R. Update on gout: New therapeutic strategies and options. *Nat Rev Rheumatol*, v. 6, n. 1, Jan, p. 30–38, 2010.

TREVISAN, G. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med*, v.72, Jul, p. 200–209, 2014.

WANG, Y et al. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Des Devel Ther*, v. 23, n. 8, Out, p. 2075-88 2014.

WATANABE, T et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gout*, v.57, n.2, Feb, p.181-187, 2008.

WONG, M et al. Design and synthesis of irreversible analogues of bardoxolone methyl for the identification of pharmacologically relevant targets and interaction sites. *J Med Chem*, v. 59, n. 6, Mar, p. 2396-409.

YATES, MS et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.6, n.1, Jan, p.154-162, 2007.

YATES, MS et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.6, n.1, Jan, p.154-162, 2007.

ZAMUDIO-CUEVAS, Y et al. Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy. *Clin Rheumatol*, v.34, n.10, Oct, p. 1667-72, 2015.

ZAMUDIO-CUEVAS, Y et al. Monosodium urate crystals induce oxidative stress in human synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, v.18, n.1, May, p.117, 2016.

ZHU, Y et al. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008. *Arthritis Rheum*, v.63, n.10, Oct, p.3136–3141, 2011.

ANEXO I

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PPG0872

Título

Métodos para pesquisa de mecanismos envolvidos na dor aguda e crônica para a descoberta de novos fármacos analgésicos.

Data de Entrada

01/07/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 117/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Juliano Ferreira, Departamento de Farmacologia – CCB.

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: dois mil trezentos e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*) e dois mil trezentos e quatro camundongos (*Mus Musculus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e Laboratório de Farmacologia Experimental.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 07/02/2018

Data 07/11/2013

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE